

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

3/5/3

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008430324

WPI Acc No: 1990-317325/199042

XRAM Acc No: C90-137320

New human serum albumin fragments - used to bond to medicines and for stable folding of protein(s)

Patent Assignee: TONEN CORP (TOFU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2227079	A	19900910	JP 89217540	A	19890825	199042 B

Priority Applications (No Type Date): JP 88250926 A 19881006; JP 89217540 A 19890825

Abstract (Basic): JP 2227079 A

Human serum albumin protein fragment (A) comprising a centre part of human serum albumin, human serum albumin fragment (B) lacking in the C-terminal portion of human serum albumin, and human serum albumin fragment (C) lacking in the n-terminal portion of human serum albumin are new.

(A) pref. has an amino acid sequence of 123-methionine to 303-proline of human serum albumin. (B) has an amino acid sequence of 1-aspartic acid to 303-proline; and (C) has an amino acid sequence of 123-methionine to 585-leucine. (A), (B) or (C) may be fused with a signal peptide of E. coli alkaline phosphatase to give a fused protein. A plasmid contg. a DNA sequence to code the fused protein is introduced into a host for transformation, and the transformant host is incubated to express the corresp. human serum albumin protein fragment or fused protein.

USE/ADVANTAGE - C-terminal lacking fragment (B) does not bond to long-chain fatty acids but bonds to medicines at the remaining centre part. N-terminal lacking fragment (C) is used for stable folding of proteins. Centre part fragment (A) has both characteristics of (B) and (C). (24pp Dwg.No.0/0)

Title Terms: NEW; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; FRAGMENT; BOND; MEDICINE; STABILISED; FOLD; PROTEIN

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-037/04; C07K-013/00; C07K-015/06; C12N-001/21; C12N-015/14; C12P-021/02

File Segment: CPI

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-227079

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月10日

C 12 N 15/14

C 07 K 13/00

15/06

C 12 N 1/21

15/62

C 12 P 21/02

ZNA C

8318-4H

8318-4H

8515-4B

8214-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全24頁)

⑮ 発明の名称 ヒト血清アルブミン断片

⑯ 特 願 平1-217540

⑰ 出 願 平1(1989)8月25日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)10月6日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-250926

㉑ 発 明 者 榎 昇 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1-4-6

㉒ 発 明 者 八 木 慎 太 郎 埼玉県朝霞市朝志ヶ丘4-8-8 グリーンパーク朝志ヶ丘101

㉓ 発 明 者 鈴 木 正 則 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡2-11D-101

㉔ 出 願 人 東 燃 株 式 会 社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉕ 代 理 人 弁 理 士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ヒト血清アルブミン断片

## 2. 特許請求の範囲

1. ヒト血清アルブミンの中央部分からなるヒト血清アルブミン蛋白質断片。

2. ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有する請求項1に記載の断片。

3. ヒト血清アルブミンの中央部と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

4. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドと、ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有するポリペプチドとから成る請求項3に記載の融合蛋白質。

5. ヒト血清アルブミンのC末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。

6. ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有

する請求項5に記載の断片。

7. ヒト血清アルブミンのC末端部分の欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

8. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドと、ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列とから成る請求項7に記載の融合蛋白質。

9. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。

10. ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列を有する請求項9に記載のヒト血清アルブミン断片。

11. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

12. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドとヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列とから成る請求項11に記載の融合蛋白質。

13. 請求項1, 5もしくは9に記載の蛋白質断片又は請求項3, 7もしくは11に記載の融合蛋白質をコードするDNA配列。

14. 請求項13に記載のDNA配列を含有するプラスミド。

15. 前記DNA配列の上流に、該DNA配列を宿主内で効率よく発現せしめるための制御配列を含有する発現プラスミドである、請求項14に記載のプラスミド。

16. 請求項14に記載のプラスミドにより形質転換された宿主。

17. 請求項16に記載の宿主を培養してヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン蛋白質断片を切り出すことを特徴とする、ヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明はヒト血清アルブミンの部分から成る蛋白質断片に関する。この蛋白質断片は薬物等の運搬・供給系のキャリアー等としての用途が期待される。

#### (従来の技術)

ヒト血清アルブミンはヒト肝臓で合成される分子量66,458の高分子血漿蛋白質で、生体内では主に血液の浸透圧調節、種々の物質(例えば脂肪酸、 $\text{Cu}^{2+}$ ・ $\text{Ni}^{2+}$ などの金属イオン、胆汁ビリルビン、多くの薬物、一部の水溶性ビタミン、など)と結合してそれらの標的臓器への運搬、組織へのアミノ酸供給源、などの重要な役割を果たしている。これらの作用を基礎にして火傷や腎炎などによるアルブミンの喪失や肝硬変などによるアルブミン合成の低下で起こる低アルブミン血症や出血性ショックなどの治療にヒト血清アルブミンは大量に使用されている。血清アルブミンはまた、多くの薬

物と非特異的に結合し、それらの血中運搬の役割を果たしている。アルブミンと結合した薬物は血液循環によって体内を動き、やがてアルブミンと遊離して毛細血管壁を通過して拡散し、作用部位へと到達すると考えられている。アルブミンは毒性が少ない、抗原性が低い、生体内で簡単に分解する、薬物との共有結合及び複合体形成が簡単である、等のドラッグデリバリーのための担体(ドラッグキャリアー)として優れた特徴を有しており、また各種薬剤の結合サイトも決定または推定されているものが多く、製剤化のためのデザインが簡単にできるという利点も有している。

基本的にはヒト血清アルブミンの断片でも推定されている多くの薬剤に対する結合部位はほとんど含んでおり、ドラッグキャリアーとしての活性を示すことができると考えられる。薬物等の運搬・供給系におけるキャリアー等として使用する場合には、薬物等との結合性を限定する等の見地から、むしろヒト血清アルブミン分子全体を使用するよりもその断片を使用する方が有利であると予想さ

れる。

一般に、蛋白質を切断してその断片を調製する方法として、蛋白質を臭化シアンのごとき化学物質又はトリプシン、ペプシン等のプロテアーゼを用いる方法が知られている。しかしながら、これらの方法においては、蛋白質のアミノ酸配列に依存して切断部位が必然的に定まるため、任意の部位で切断することができず、従って理想的な蛋白質断片を得ることはできない。従って、ヒト血清アルブミンについてもその様な断片は得られていない。

#### (発明が解決しようとする課題)

これに対して、組換えDNA技術を用いれば、任意の部分からなるヒト血清アルブミン断片を適当な宿主細胞中で合成させることができる。従って本発明は、ヒト血清アルブミンの所望の蛋白質断片をコードするDNAを作製し、これに基づく組換えDNA技術により、ヒト血清アルブミンの蛋白質断片及びその製造手段を提供しようとするもの

である。

さらに詳しくは、本発明は、ヒト血清アルブミンの中央部分からなるヒト血清アルブミン蛋白質断片、及びヒト血清アルブミンの中央部と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質；ヒト血清アルブミンのC-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質、並びにヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質；これらの蛋白質断片又は融合蛋白質をコードするDNA；該DNAを含有するプラスミド；該プラスミドにより形質転換された宿主；及び前記宿主を培養してヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン断片を切り出すことを特徴とするヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法に関する。

#### 〔具体的な説明〕

正常ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAはすでにクローン化されている（特願昭63-037453）。従って、このcDNAを用いて、遺伝子工学的手法により正常ヒト血清アルブミンAの任意の断片を製造することができる。

本発明は、このような断片として、（1）ヒト血清アルブミンの中央部分から成る血清アルブミン断片、（2）ヒト血清アルブミンのC-末端を欠失した血清アルブミン断片、及び（3）ヒト血清アルブミンのN-末端を欠失した血清アルブミン断片を提供する。本発明は例えば、ヒト血清アルブミンの中央部分から成る血清アルブミン断片として正常ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有するアルブミン断片について記載し、C-末端が欠失したアルブミン断片の例として正常ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有するアルブミン断片（これをミニHSAと称する場合がある）に

ついて記載し、そしてN-末端が欠失したアルブミン断片の例として正常ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片（これを短縮HSAと称する場合がある）について記載する。

これら本発明の3つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ下記のごとき特徴を有している。

本発明のアルブミン断片は、いずれもヒト血清アルブミンの中央部分を含有している。この様に、中央部分を含めたのは、ヒト血清アルブミン分子上の薬剤結合位置は現在までに4つ（サイトI～IV）知られており（Sjöholm, I., Ekman, B. E., Kober, A., Ljungstedt-Pahlman, J., Seiving, B. & Sjödin, T. *Mol. Pharmacol.* **16**, 767- (1979)）、これらのサイトにおいて薬剤の結合に重要な役割を果たすアミノ酸残基もいくつか知られている（Pehske, K. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 688- (1981)）が、そのほとんどがこの中央部分に集中しているためである。

Sjöholmらは薬剤をヒト血清アルブミンに均一

に分散させた小球体を使い、多種の薬剤の結合位置を調べ、ジアゼパムサイト（サイトI）、ジギトキシンサイト（サイトII）、及びワルファリンサイト（サイトIII）に分類しているが、この他にタモキシフェン（サイトIV）またはビリルビン結合サイトが存在するらしい。Pehskeらはジアゼパムサイト、ワルファリンサイト、ビリルビン結合サイトにおいて重要な役割をしているアミノ酸として各々Lys195とHis146及びArg145, Trp214及びLys199, Lys240を推定している。一方バルミチン酸塩のような長鎖脂肪酸の結合サイトはC端側領域にあるらしく（Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. & Peters, T. *Tr. Biochemistry*, **14**, 4578- (1975); Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D. & Sklar, L. A. *J. Biol. Chem.* **254**, 391- (1979)）、本発明のヒト血清アルブミンの中央部分から成るヒト血清アルブミン断片、又はC-末端部分を欠失したヒト血清アルブミン断片を利用すれば長鎖脂肪酸が結合できず、ジアゼパム、ワルファリン等が結合できるドラッグキャリアーの作製が可能とな

る。

ヒト血清アルブミンは585個のアミノ酸から成る高分子蛋白質で、しかも分子内に35個のシステイン残基を有し、そのうち最もN端側に位置するシステイン残基(Cys-34)のみが遊離のSH基を有する状態で存在し、その他のものは互いにジスルフィド(S-S)結合を形成し、計17個のS-S橋が分子内に形成されている。蛋白質分子の高次(立体)構造形成の過程で少なくとも2種の酵素〔ペプチジルプロリルcis-trans イソメラーゼ及びプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)〕が関与していることが最近明らかになってきたが、S-S橋形成に重要な役割を果たすのは後者のPDIである。血清アルブミンを産生する哺乳類の細胞内では生合成及び血清アルブミン蛋白質の細胞内輸送の過程でPDIが働き蛋白質分子内にS-S橋が形成され、PDIの主な存在場所は小胞体を含むミクロソーム画分であることが知られている。大腸菌をはじめとする原核生物細胞内でヒト血清アルブミンを生合成させた場合上述のよ

うな反応が起き、分子内に正しいS-S橋が形成される保証はなく、Cys-34が分子内のシスチン残基とチオール/ジスルフィド交換反応を起こし、S-S橋のかけ違えが生じ、異性体を生じる可能性がある。このように遊離のSH基を有するシステイン残基が存在すると本来あるべき正常な立体構造をとった蛋白質ができる効率が低くなり、異常な立体構造をとった蛋白質は機能的にも正常でなくなる危険性が大となる。これに対して、本発明のN-末端部分が欠失した、123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片では、Cys34が他の6個のアミノ末端側に位置するシステインと共に除かれており、このような危険性を少なくしてある。

本発明においては、前記3つのタイプのアルブミン断片の代表例として特定のアミノ配列範囲を有する3種類のアルブミン断片を具体的に記載するが、3つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ前記のごとき特徴を有しており、それらの特徴を発揮することができるアルブミン断片はすべて本

発明の範囲に属する。例えば、薬剤結合部位が集中している中央部分として第123位のメチオニンから303位のプロリンまでの範囲を例示したが、中央部分は必ずしもこの範囲に限定されず、薬剤結合部位の大部分を含む範囲であれば、第123位～303位よりも長くても、短かくてもよい。また、長鎖脂肪酸の結合部位が存在し、従って除去されるべきC-末端側領域として304位からC-末端までの範囲を例示したが、これに限らず、長鎖脂肪酸の結合部位を含む範囲であれば、さらに長い範囲でもよく、又短い範囲でもよい。さらに、システインを多数含有し、従って除去されるべきN-末端の範囲としてN-末端から122位までの範囲を例示したが、第34位のシステインを含有するN-末端側領域であればN-末端から122位までの範囲に限定されるものではなく、さらに長い又は短い範囲であってもよい。

従って、次の条件を考慮しながら種々のアルブミン断片をデザインすることができ、それらは本発明の範囲に属する。ヒト血清アルブミンの断片

をデザインするために重要な条件として、特定の薬物結合に必要な立体構造を保持することが期待できるような断片を選定することが重要である。この際注意すべきことは(i)天然のヒト血清アルブミンの構造中に存在するS-S橋をそのままの形で保持させること、(ii)そのため断片を構成するポリペプチド鎖中には偶数個のシステイン残基を有すること、(iii)S-S橋で結ばれてループを形成しているポリペプチド鎖の途中に切断を入れないこと、即ち天然ヒト血清アルブミン分子中にいくつか存在する主要なドメイン構造あるいは少なくともサブドメイン構造は破壊しないこと、などがあげられる。

以上の点はたとえば不溶化した形で細胞からとり出したヒト血清アルブミン断片をin vitro(試験管内)で可溶化し、本来の正常な立体構造(S-S結合も含めて)をとらせようとする場合に特に重要なことである。このようなin vitroでの立体構造形成(リフォールディング)反応にはペプチジルプロリルcis-trans イソメラーゼやPDI

が使われる可能性がある。

正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAの作製方法は参考例1において具体的に記載する。目的とする蛋白質断片をコードするDNAは、その全体を常法に従って化学合成することもでき、又前記のcDNAから調製することもできる。cDNAから調製する場合、正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端の内側で、適切な制限エンドスクレアーゼにより切断し、不足の末端コード配列を化学合成したDNAにより補完することにより調製される。あるいは、cDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端外側で、適切な制限エンドスクレアーゼにより切断した後、余分のDNA部分をエキソスクレアーゼにより除去することもできる。上記2つの方法の内5'末端と3'末端の加工において異なる方法を組み合わせて用いることもできる。

本発明の例においては、正常ヒト血清アルブミ

ンのアミノ酸配列中のMet(123)-Pro(303)から成る蛋白質断片をコードするDNAとして、Met(123)-Ala(151)をコードする合成DNA(第1図)とPro(152)-Pro(303)をコードするcDNA(第8-1図~第8-2図中〔 〕で示した部分)とを連結したものを使用する。アルカリホスファターゼのシグナルペプチドとミニHSAの融合蛋白質をコードするDNAとしては既に特願昭63-037453に記載のアルカリホスファターゼのシグナルペプチドと全長のヒト血清アルブミン分子との融合蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドpUC-phoA-HSA-Aからアルカリホスファターゼのシグナルペプチド及びヒト血清アルブミンAのAsp1~Pro152までをコードするDNAを特願昭63-268302に記載のプラスミドpUC-HSA-I'から切り出したGlu153~Pro303をコードするDNA断片とを融合したものを使用する。短縮HSAをコードするDNAとしては上記で作製したMet123-Pro303をコードするDNAのうち合成DNA部分(Met123-Ala151)を切り出したものと特願昭63-037453に記載の

pUC-phoA-HSA-Aから切り出したPro152-Leu585のコード領域および3'側非翻訳領域を含むDNA配列とを連結したものを使用する。

本発明の正常ヒト血清アルブミン断片をコードするDNAは、それ自体として発現させることもできるが、他のペプチドをコードするDNAと連結した状態で発現せしめ、融合蛋白質を得ることができる。このような融合蛋白質を得る場合の融合パートナーとして種々のペプチドを用いることができ、その1つとして例えば大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドが挙げられる。目的とするヒト血清アルブミン断片をこのような融合蛋白質として得る場合には、その後、シグナルペプチドを除去してヒト血清アルブミン断片を得ることができる。

ヒト血清アルブミン断片の発現のためには、例えば前記のごとき融合蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクター、例えばプラスミドに挿入した後、該ベクターを宿主に導入する。発現用宿主としては動物細胞や酵母のごとき真核細胞、及

び細菌のごとき原核細胞を用いることができ、ベクターは宿主に依存して選択される。細菌での発現用プラスミド中では、ヒト血清アルブミン断片又は該断片を含む融合蛋白質をコードするDNAをプロモーター及びSD配列を含む発現制御領域のもとに置く。プロモーターとしては、例えばlrrpプロモーター、lacプロモーター、 $\lambda$ ファージプロモーター(P<sub>l</sub>, P<sub>l'</sub>)、tufBプロモーター、もしくはrrnBプロモーター、又はこれらのハイブリッドプロモーターを使用することができる。

発現ベクター、例えばプラスミドによる宿主、例えば大腸菌の形質転換は常法に従って行うことができる。大腸菌の培養は常法により行う。目的のタンパク質の生産のためには、大腸菌が一定のレベルに増殖した後、誘発処理を行うことにより目的とする遺伝子の発現を誘導する。誘導の方法は使用されるプロモーターにより異なり、例えばlrrpプロモーターを用いる場合には、3- $\beta$ -インドールアクリル酸を培地に添加することによ

り誘導を行うことができる。

大腸菌を宿主とする場合、目的蛋白質は主として細胞内に蓄積する。このため、蛋白質の回収のためにはまず培養菌体を集め、これを必要に応じて洗浄した後、水、又は緩衝液に再懸濁し、細胞を破壊する。目的とする蛋白質は主として不溶性画分に含まれるため、例えば遠心分離により不溶性画分を集め、必要により洗浄する。次に、不溶性画分を蛋白質可溶化用緩衝液、例えばドデシル硫酸ナトリウム及び2-メルカプトエタノールを含有する緩衝液に移すことにより蛋白質を可溶化する。

次に、ヒト血清アルブミン断片の融合蛋白質を含有するこの溶液から、常法に従って該蛋白質を回収・精製する。融合蛋白質を開裂せしめることにより目的とするヒト血清アルブミン断片の融合蛋白質を得るには、大腸菌のリーダーペプチダーゼ(シグナルペプチダーゼI)によりインビトロで分解する方法(Zwizinski, C. 及び Wickner, W., J. Biol. Chem. 255, 7973 (1980))を用いることが

できる。また融合蛋白質に臭化シアンを作用させればCys124-Met298の断片が得られる。

#### (発明の効果)

本発明のC-末端領域を欠失したアルブミン断片は、C-末端に存在する長鎖脂肪酸の結合部位を欠いているため、長鎖脂肪酸を結合せず、しかも中央領域により種々の薬物と結合することができるという特徴を有する。他方、N-末端領域を欠失したアルブミン断片はCys34及び他の多数のシステイン残基を欠いており、蛋白質の安定なフォールディングのために有利である。さらに、ヒト血清アルブミンの中央部分のみから成るアルブミン断片は、前記両方の特徴を有する。

次に、本発明のヒト血清アルブミン断片の製造について、実施例により具体的に説明する。

なお、実施例中に特に記載しない場合、DNAの処理のための酵素反応は次の条件によった。

#### 制限酵素反応

Msp I (ニッポンジーン、10単位/ $\mu$ l)、

BamH I (ニッポンジーン、35単位/ $\mu$ l)、Cla I (ニューイングランドバイオラプス、5単位/ $\mu$ l)、Hind III (ニッポンジーン、12単位/ $\mu$ l)、及びEcoR I (ニッポンジーン、12単位/ $\mu$ l)の場合：DNA 1  $\mu$ g、酵素 1  $\mu$ l、10X EcoR I 緩衝液 (1M Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM NaCl) 3  $\mu$ lに滅菌蒸留水を加えて30  $\mu$ lとする。37℃、1時間保温して切断を完了させる。Sal I 及び Xba I (ニッポンジーン、15単位/ $\mu$ l)の場合は10X EcoR I 緩衝液の代わりに100mM Tris-HCl (pH 7.5)、70mM MgCl<sub>2</sub>、1.75M NaCl、70mM 2-メルカプトエタノール、2mM EDTA、0.1%ウシ血清アルブミンを使用する。

Pst I (ニッポンジーン、12単位/ $\mu$ l) 及び Sph I (宝酒造、10単位/ $\mu$ l)の場合はNaClの濃度を2倍にする。

#### バクテリアアルカリ性ホスファターゼによる処理

DNA 1  $\mu$ g、制限酵素EcoR I 及びHind III 各々 1  $\mu$ l、10X EcoR I 緩衝液 2  $\mu$ l、滅菌蒸留水を加えて20  $\mu$ lとし、37℃で1時間保温した後、90℃、5分

間加熱し酵素を失活させる。次に、滅菌蒸留水38  $\mu$ l、バクテリアアルカリ性ホスファターゼ 2  $\mu$ l (宝酒造 0.5単位/ $\mu$ l)を加えて37℃、1時間保温した後、フェノール抽出を行い、得られた水層をエタノール沈澱に用いる。

#### T4 DNAリガーゼ処理

たとえばベクターDNA 1  $\mu$ g、ベクターDNAと等モル量のDNAフラグメント、10X リガーゼ緩衝液 (660mM Tris-HCl (pH 7.5), 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM ジチオスライトール、1mM ATP) 3  $\mu$ l、T4 DNA リガーゼ 1  $\mu$ l (宝酒造、約400単位/ $\mu$ l)、滅菌蒸留水を加えて30  $\mu$ lとし16℃で一晩保温する。合成フラグメントのT4ポリヌクレオチドキナーゼによる5'-リン酸化

50mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ジチオスライトール、0.2mM ATPを含有する溶液 (25  $\mu$ l) 中でDNAフラグメントの各々の分量 (約30pmoles) を6単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) で37℃、60分間処理することにより5'端をリン酸化する。リン酸化されたフ



ラグメントを含む溶液を混ぜ(計 100  $\mu$ l) 100℃の水浴に5分間放置した後室温で放冷しアニーリングを行う。2  $\mu$ lのT4 DNAリガーゼを加え16℃で一晩保温し、フラグメント間を連結し、二本鎖フラグメントとする。

#### 大腸菌DNAポリメラーゼI反応

DNA 1  $\mu$ l、DNAポリメラーゼI (Klenowフラグメント、宝酒造35単位/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、1 mM dXTP (dATP, dGTP, dCTP, TTPの混合物) 1  $\mu$ l、10X緩衝液(70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 70 mM MgCl<sub>2</sub>) 3  $\mu$ lに滅菌蒸留水を加えて全量を30  $\mu$ lとし、37℃で30分間保温する。

#### 実施例1. Met(123)-Ala(151)をコードするDNA

##### Aの合成

5' 端にBamHI付着端をもち、3' 端付近にHpaII (HspI) 認識配列をもち、その二本鎖部分がヒト血清アルブミンのMet(123)-Ala(151)を完全にコードする遺伝子断片の構築を以下のように行った。大腸菌での発現を効率よくするために大腸菌で高い効率で発現される遺伝子によってよく

使用されるコドン(preferential codons)をできるだけ多く含むよう配列をデザインした。これらのコドンに対するtRNA種は一般に大腸菌内に多量に存在しており(たとえば、Ikemura, T. J. Mol. Biol. 151, 389-409(1981); Gouy, M. & Gautier, C. Nucleic Acids Res. 10, 7055-7074(1982))、翻訳効率に影響することが期待される。第1図にデザインされた配列を示す。

実際の合成に当っては、次の4種類のオリゴヌクレオチド:

5' -GATCCATGTGCACCGCTTTCACGACAACGAAGAAACC  
TTCC-3'

5' -AGGTATTTTTTCAGGAAGGTTTCTTCGTTGTCGTGGAA  
AGCGGTGCACATG-3'

5' -TGAAAAAATACCTGTACGAAATCGCTCGTCGTCACCCG  
TACTTCTACGCTCCGG-3'

5' -CGAAGAACAGCAGTTCGGAGCGTAGAAGTACGGGTGA  
CGACGAGCGATTTCGTAC-3'

をCaruthersら(Matteucci, M. D. 及びCaruthers, M. H. Tetrahedron Letters 21, 719(1980))により開発されたホスホアミグイト法を応用した自動合成機(Applied Biosystems モデル380B)を用いて

合成した。合成されたDNA鎖(約30  $\mu$ moles) 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mMジチオスライトール及び0.2 mM ATPを含有する溶液(50  $\mu$ l)中で6単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)存在下で37℃、60分間処理することにより5'一端をリン酸化した。

リン酸化されたフラグメント4本を混ぜ100℃の水浴中に5分間保温しついで室温で放冷してアニーリングを行った。2  $\mu$ lのT4 DNAリガーゼ(800単位、宝酒造)を加えて16℃で一晩保温しフラグメント間を連結して二本鎖フラグメントとした。次にこの二本鎖フラグメントをHpaII (HspI)で切断して96bpのフラグメントを得た。

#### 実施例2. ヒト血清アルブミン断片Met(123)-Pro(303)をコードするDNA断片の作製(第2図)

正常ヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドンが翻訳終止コドンに変化している配列を含む $\lambda$ gt11ヒトcDNAクローン(HSA-1A)(参

考例1: 第6図)をEcoRIにより切断してヒト血清アルブミンcDNA部分を切り出し、これをプラスミドpUC 19のEcoRI部位に挿入してプラスミドpUC-HSA-Iを作製した。

pUC-HSA-IをPstIで切断し、生じた5' 端のリン酸基をバクテリアアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、HpaII (HspI)で切断して750bpのフラグメントを切り出した。この750bpのフラグメントを実施例1において合成した96bpのフラグメントとT4 DNAリガーゼでHpaII (HspI)の付着末端同士の対合を利用して結合した後、pUC 19のBamHIとPstIの二重消化物の大きい方のフラグメントとT4 DNAリガーゼにより連結しpSAL II プラスミドを得た。

#### 実施例3. 融合蛋白質発現用プラスミドpAT-trp-phoA-SAL IIの作製(第3図)

pSAL IIをBamHIで処理して開環し末端を大腸菌DNAポリメラーゼIで処理し、平滑末端とした後、HindIIIで切断しHSA cDNAを含む750bpのフラグメントを得た。一方pUC 19プラスミドにて大腸

菌アルカリ性ホスファターゼ(phoA)のシグナルペプチドをコードする人工リーダー配列を組み込んだプラスミドpUC-phoA(参考例2)をHpaII(MspI)で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼIで平滑末端とした後EcoRIで切断し、リーダー配列を含む69bpのフラグメントを得た。このフラグメントとpSALII由来の正常ヒト血清アルブミンcDNAの一部を含む750bpのフラグメントをT4 DNAリガーゼで連結し、さらにpUC19のEcoRIとHindIIIの二重消化物のうち大きい方のフラグメントと連結しリーダー配列とHSA cDNA部分がつながったpUC-phoA-SALIIプラスミドを得た。このようにして連結されたphoAシグナルペプチドをコードするリーダー配列とHSA cDNAの一部の間にはヌクレオチド配列GGATCCがアダプター配列として生じ、2個のアミノ酸Gly-Serをコードするために実際にこの融合遺伝子により合成される融合蛋白質はphoAシグナルペプチド-Gly-Ser-Met123~pro303という構造をとる。

融合蛋白質を大腸菌で発現させるためにphoAシ

グナルペプチド-正常ヒト血清アルブミンの融合タンパク質の発現に用いたpAT-trp-phoA-HSA-A(参考例3及び4;特願昭63-037453)を利用した。pAT-trp-phoA-HSA-AをEcoRIとHindIIIで二重消化し、phoAリーダー配列-HSAcDNA部分を含まない大きい方のフラグメントを、pUC-phoA-SALIIプラスミドをEcoRIとHindIIIにより二重消化して得られる800bpのフラグメントとT4 DNAリガーゼにより連結しpAT-trp-phoA-SALIIプラスミドを得た。

pAT-trp-phoA-SALIIプラスミドを大腸菌HB101に形質転換法により導入し大腸菌HB101(pAT-trp-phoA-SALII)を得た。

この大腸菌は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第10308号(PERM P-10308)として寄託されている。

#### 実施例4. 融合蛋白質の発現

pAT-Trp-phoA-SALIIを保有する大腸菌による大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドとヒト血清アルブミン断片の融合蛋白質を次の

ようにして発現させた。

#### 培 養

pAT-Trp-phoA-SALIIを持つ大腸菌HB101株を5mlの、アンピシリンを25mg/ml含むルリア(LB)培地(バクトトリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%)に接種し、37℃18時間振とう培養した。この培養液0.2mlをアンピシリンを25mg/ml含む5mlのM9-CA培地(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%, NaCl 0.5%, NH<sub>4</sub>Cl 0.1%, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, MgSO<sub>4</sub> 2mM, カザミノ酸0.8%)に接種し、30分37℃で培養した後、誘導物質である3-β-インドールアクリル酸(IAA)を20mg/mlとなるよう加えた。さらに37℃で5~7時間振とう培養を行った。

#### 不溶性画分の抽出

上記のように培養した培養液を7000rpm、5分遠心し、集菌した。沈殿した菌体を20%ショ糖、25mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM EDTA、1mM PMSF(ふっ化フェニルメチルスルホニル)に再浮遊させ、卵白リゾチームを0.2mg/ml加えた。37

℃15分静置することにより、外膜が消化され、プロトプラスト(スフェロプラスト)が得られた。この浮遊液を氷中に移し、冷却した後、10000rpm、10分遠心し、スフェロプラストを沈殿させた。このスフェロプラストを20%ショ糖液(25mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM EDTA)に再浮遊させ、氷浴中でポリトロンホモゲナイザー(ダイヤル値:8)により破碎した。4℃において破碎液を15,000rpm、20分遠心し、菌体残渣を得た。この菌体残渣を25mM Tris-HCl(pH7.5)に再浮遊させ、4℃において浮遊液を15,000rpm、20分遠心した。この操作をさらにもう一回行い、得られた沈澱を不溶性画分として得た。

#### S D S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

##### 1) 菌体総蛋白質の分析

培養液0.5mlを7000rpm、5分遠心し、集菌した。菌体を10mlのSDS-サンプル液(62.5mM Tris-HCl(pH6.8)、2% SDS、10%ショ糖、5%2-メルカプトエタノール)に浮遊させ、100℃5分処理した。これを分離ゲル濃度10%の

SDS-ポリアクリルアミドゲル (Laemmli の方法: Nature(London)277, 680(1970)) にアプライし、電気泳動を行った。

### 2) 不溶性画分の分析

残査を25mM Tris-HCl (pH 7.5) に再浮遊させ、一部をとり、SDS-サンプル液で希釈した。

100℃ 5分処理することにより、不溶性蛋白質を可溶化させ、ゲル電気泳動を行った。

### 3) 染色及び脱色

泳動終了後、ゲルは染色液 (クマシーブリリアント・ブルー0.25%、エタノール45%、酢酸10%) に30分間～1時間浸し、染色した。染色されたゲルは脱色液 (メタノール5%、酢酸10%) を満たした脱色装置 (バイオラッド社製、モデル 556型) に移し、脱色した。

### ウェスタンブロットと免疫交差反応

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動終了後、ゲルをガラス板よりはずした。ゲルサイズに切断したニトロセルロースフィルター (Bio-rad, Trans-blot®)、及びワットマン社製3MM濾紙

(2枚) をブロッティング液 (0.3% Tris、1.44%グリシン、20%メタノール) に浸した。ブロッティング液であらかじめ浸したスコッチ・パッド上に濾紙、ゲル、フィルター、濾紙の順に重ね合わせ、スコッチパッドではさみ、ブロッティング装置 (TEPCO社製、Model: TC-808) にセットした。ブロッティング液をみだし、200mA、1時間電気泳動を行った。

泳動終了後、フィルターをゲルからはがし、TBS液 (25mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl) で10分処理した。3%ゼラチン入りのTBS液で30分処理した後、フィルターを0.025% Tween-20の入ったTBS液 (TTBS液と以下略) に移し、5分処理し、さらに同操作をくり返した。抗ヒトアルブミン-ウサギ血清のIgG画分 (カッペル社製) を1%ゼラチン入りのTTBS液で2000倍に希釈し、この液中にフィルターを浸し、2～18時間処理した。次に、フィルターをTTBS液中に移し5分処理した。この操作をさらに2回行った。抗ウサギIgG-ヤギー-西洋ワサビ・ペルオキシ

ダーゼ標識抗体 (Bio-rad社製) を1%ゼラチン含有のTTBS液で3000倍に希釈した液中にフィルターを移し、2時間処理した。同処理後、フィルターをTTBS液で2回、TBS液で1回、それぞれ5分間洗った。0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.05% HRPカラーデベロップメント・リジェント (Bio-rad社)、16.7%メタノール含有のTBS液にフィルターを浸し、15分反応させた。次に、フィルターを水につけ30分放置した。抗ヒト・アルブミン抗体と交差する物がある所は、濃い紫色に発色した (第4図)。分子量 21000の位置に本発明の発現生成物が認められた。

### 実施例5. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとミニHSAとの融合タンパク質をコードするDNA配列を含むプラスミドpUC-phoA-mHSAの作製 (第9図)

大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドと成熟ヒト血清アルブミンAの融合タンパク質をコードするDNA配列を含む参考例3に記載

のpUC-phoA-HSA-AをEcoRIとMspIで二重消化し、アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドのアミノ末端のメチオニンコドンの直前から成熟ヒト血清アルブミンAの152位のプロリンのコドンまでの領域 (約500bp) を切り出した。一方前駆体プロヒト血清アルブミンAのうち成熟ヒト血清アルブミンAの303位のプロリンまでをコードするが、304位のセリンのコドン (TCA) がオーバーコドン (TGA) に置換されたDNA配列を含む組換えプラスミドpUC-HSA-1'をMspIとXbaIで二重消化し、153位のグルタミン酸から356位のトレオニンまでの領域をコードする (しかし304位のオーバーコドンで翻訳は終了するので実際には303位のプロリンまでの領域をコードする) 約610bpのDNA断片を得た。これら2つのDNA断片を、プラスミドベクターpUC18をEcoRIとXbaIとで二重消化して得た大きな方の断片 (約2660bp) と連結させることにより、大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドと成熟ヒト血清アルブミンAのAsp1-Pro303の領域

域からなる融合タンパク質(phoA-mHSA)をコードするDNA配列を含む組換えプラスミドpUC-phoA-mHSAを構築した。

**実施例6. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとミニHSAとの融合タンパク質phoA-mHSAを発現するための組換えプラスミドpAT-trp-phoA-mHSAの作製(第9図)**

上記プラスミドpUC-phoA-mHSAをEcoRIとHindIIIで二重消化し、大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとミニHSAとの融合タンパク質をコードするDNA配列を切り出し、これを、大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドと成熟ヒト血清アルブミンAの融合タンパク質の製造に用いた組換えプラスミドpAT-trp-phoA-HSA-AからEcoRIとHindIIIとの二重消化により切り出した大きい方のDNA断片と連結した。組換えプラスミドpAT-trp-phoA-HSA-Aは大腸菌トリプトファンプロモーターの下流に存在するEcoRI認識部位の下流に大腸菌アルカリ性ホスファターゼ

シグナルペプチドと成熟ヒト血清アルブミンAの融合タンパク質をコードするDNA配列及びその3'側非翻訳配列が位置しその最後にHindIII認識部位が配置されている構造をとっている。従って、EcoRIとHindIIIを用いた二重消化により得られた大きな方のDNA断片は大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドと成熟ヒト血清アルブミンAの融合タンパク質をコードするDNA配列を欠いた形となり、大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとミニHSAとの融合タンパク質をコードするDNA配列を含むEcoRI-HindIII断片と連結することにより、大腸菌トリプトファンプロモーター制御下に該融合タンパク質を発現できる構造を持った組換えプラスミドpAT-trp-phoA-mHSAを構築できた。

pAT-trp-phoA-mHSA プラスミドを大腸菌HB101に形質転換法により導入し、大腸菌HB101(pAT-trp-phoA-mHSA)を得た。この大腸菌は微工研菌寄第10952号(FERM P-10952)として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

**実施例7. 短縮HSAをコードするDNAを含む組換えプラスミドpUC-tHSAの作製(第10図)**

前記組換えプラスミドpSAL IIは成熟ヒト血清アルブミンAのMet123からPro303までをコードするDNA配列を含んでおり、BamHIとMspIとの二重消化によりMet123-Ala151をコードするDNA断片(約90bp)をこれから切り出した。一方、上記プラスミドpUC-phoA-HSA-AをMspIとHindIIIとで二重消化して、Pro152から成熟ヒト血清アルブミンAのカルボキシル末端であるLeu585をコードしさらにその3'側非翻訳配列を含む約1350bpの断片を得た。これら2つの断片をpUC18をBamHIとHindIIIとで二重消化して得た約2660bpのDNA断片と連結し、Met123-Leu585(短縮HSA)をコードするDNA配列を含む組換えプラスミドpUC-tHSAを構築した。

**実施例8. 短縮HSAを発現させるための組換えプラスミドpAT-trp-tHSAの作製(第10図)**

短縮HSA(Met123-Leu585)を融合型ではなく直接発現させるのに大腸菌トリプトファンプロモーターを用いた。プラスミドベクターpAT153を基本にして大腸菌トリプトファンオペロン由来のプロモーター及びtrpLのSD配列を組み込んだ発現用プラスミドベクターpAT-trpをトリプトファンオペロン由来の配列の下流にあるClaI認識部位で切断し、開環させた後、大腸菌DNAポリメラーゼIで処理しスクレオチド重合反応により末端の一本鎖部分を埋めた。次に、SphIで切断し、大きい方のDNA断片を得た。一方、成熟ヒト血清アルブミンAのMet123-Pro303(SAL II)をコードするDNA配列を含む組換えプラスミドpSAL IIをMet123コドンの直前にあるBamHI認識部位で切断した後、大腸菌DNAポリメラーゼIによるスクレオチド重合反応を行い、末端の一本鎖部分を埋めた。次に、SphIで切断し、SAL IIをコード

するDNA配列を含む小さい方のDNA断片を得た。この2つのDNA断片を連結し大腸菌トリプトファンオペロン由来配列の下流にSALⅡをコードするDNA配列が配置された組換えプラスミドpAT-trp-SALⅡを作製した。このpAT-trp-SALⅡをSALⅡDNA配列の下流に位置するSalⅠ認識部位で切断した後、大腸菌DNAポリメラーゼⅠで一本鎖DNA部分を埋め、さらにBamHⅠによりSALⅡDNAの5'末端の部位で切断し、SALⅡDNAを切断・除去した。こうして得た大きな方のDNA断片をpUC-tHSAプラスミドをHindⅢで切断し、大腸菌DNAポリメラーゼⅠで一本鎖部分を埋め、BamHⅠで切断して得た短縮HSAをコードするDNA配列を含むDNA断片と連結し短縮HSA発現用組換えプラスミドpAT-trp-tHSAを構築した。pAT-trp-tHSAプラスミドを大腸菌HB101に形質転換法により導入し大腸菌HB101(pAT-trp-tHSA)を得た。この大腸菌は微工研菌寄第10950号(PERM P-10950)として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

HSAをコードするDNA配列を切り出した。これら2つのDNA断片を連結し、アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドと短縮HSAがBamHⅠ認識配列GGATCCによりコードされるGly-Serのジペプチドからなるスペーサーにはさまれた形の融合タンパク質phoA-tHSAを発現する組換えプラスミドpAT-trp-phoA-tHSAを構築した。pAT-trp-phoA-tHSAプラスミドを大腸菌HB101に形質転換法により導入し大腸菌HB101(pAT-trp-phoA-tHSA)を得た。この大腸菌は微工研菌寄第10951号(PERM P-10951)として工業技術院微生物工業技術研究所に委託されている。

**実施例10. アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとミニHSAまたは短縮HSAから成る融合タンパク質及び短縮HSA単独分子の発現**

pAT-trp-phoA-mHSA、pAT-trp-tHSA又はpAT-trp-phoA-tHSAを保有する大腸菌による大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドとヒト血清アルブミン断片の融合蛋白質又は短縮型ヒ

**実施例9. 大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドと短縮HSAとから成る融合タンパク質phoA-tHSAを発現する組換えプラスミドpAT-trp-phoA-tHSAの作製(第11図)**

大腸菌アルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドとSALⅡの融合タンパク質を発現するための組換えプラスミドpAT-trp-phoA-SALⅡをSALⅡDNA配列の下流に存在するSALⅠ認識部位で切断し開環した後、末端を大腸菌DNAポリメラーゼⅠで処理し、一本鎖部分を埋めた。次にアルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドをコードするDNA配列とSALⅡをコードするDNA配列の間のスペーサー領域に存在するBamHⅠ認識部位で切断し、トリプトファンオペロン由来のDNA配列の下流にアルカリ性ホスファターゼシグナルペプチドをコードするDNA配列が連結した構造を含むDNA断片を得た。一方、pAT-trp-tHSAをHindⅢで切断後、DNAポリメラーゼⅠで処理し一本鎖部分を埋め、さらにBamHⅠで切断することにより短縮

ト血清アルブミンA断片を単独で次のようにして発現させた。

**培 養**

pAT-trp-phoA-mHSA、pAT-trp-tHSA又はpAT-trp-phoA-tHSAを持つ大腸菌HB101株を5mlの、アンピシリンを25μg/ml含むルリア(LB)培地(バクトトリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%)に接種し、37℃18時間振とう培養する。この培養液0.2mlをアンピシリンを25μg/ml含む5mlのM9-CA培地(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%、NaCl 0.5%、NH<sub>4</sub>Cl 0.1%、CaCl<sub>2</sub> 0.1mM、MgSO<sub>4</sub> 2mM、カザミノ酸0.8%)に接種し、30分37℃で培養した後、誘導物質である3-β-インドールアクリル酸(IAA)を20μg/mlとなるよう加えた。さらに37℃で5~7時間振とう培養を行った。

**不溶性成分の抽出**

上記のように培養した培養液を7000rpm、5分遠心し、集菌した。沈殿した菌体を20%シロ糖、25mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM EDTA、1mM

PHSP (ふっ化フェニルメチルスルホニル) に再浮遊させ、卵白リゾチームを0.2 mg/ml 加えた。37℃で15分静置することにより、外膜が消化され、プロトプラスト (スフェロプラスト) が得られた。この浮遊液を氷中に移し、冷却した後、10000rpm、10分遠心し、スフェロプラストを沈殿させた。このスフェロプラストを20%ショ糖液 (25mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA 中) に再浮遊させ、氷浴中でポリトロンホモゲナイザー (ダイアル値: 8) により破碎した。4℃において破碎液を15,000 rpm、20分遠心し、固体残渣を得た。この固体残渣を25mM Tris-HCl (pH 7.5) に再浮遊させ、4℃において浮遊液を15,000rpm、20分遠心した。この操作をさらにもう一回行い、得られた沈殿を不溶性画分として得た。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

##### 1) 固体総蛋白質の分析

培養液 0.5 ml を7000rpm、5分遠心し、集菌した。固体を10mlのSDS-サンプル液 (62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、10%ショ糖、

5% 2-メルカプトエタノール) に浮遊させ、100℃5分処理した。これを分離ゲル濃度10%のSDS-ポリアクリルアミドゲル (Laemmli の方法: Nature(London)277, 680(1970)) にアブライし、電気泳動を行った。

##### 2) 不溶性画分の分析

残渣を25mM Tris-HCl (pH 7.5) に再浮遊させ、一部をとり、SDS-サンプル液で希釈した。100℃5分処理することにより、不溶蛋白質を可溶化させ、ゲル電気泳動を行った。

##### 3) 染色及び脱色

泳動終了後、ゲルは染色液 (クマシーブリリアント・ブルー0.25%、エタノール45%、酢酸10%) に30分間〜1時間浸し、染色した。染色されたゲルは脱色液 (メタノール5%、酢酸10%) を滴した脱色装置 (バイオラッド社製、モデル 556型) に移し、脱色した。

#### ウェスタンブロットと免疫交差反応

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動終了後、ゲルをガラス板よりはずした。ゲルサイズに

切断したニトロセルロースフィルター (Bio-rad, Trans-blot®)、及びワットマン社製3MM濾紙 (2枚) をブロッキング液 (0.3% Tris、1.44%グリシン、20%メタノール) に浸した。ブロッキング液であらかじめ浸したスコッチ・パッド上に濾紙、ゲル、フィルター、濾紙の順に重ね合わせ、スコッチパッドではさみ、ブロッキング装置 (TEPCO社製、Model: TC-808) にセットした。ブロッキング液をみだし、200mA、1時間電気泳動を行った。

泳動終了後、フィルターをゲルからはがし、TBS液 (25mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl) で10分処理した。3%ゼラチン入りのTBS液で30分処理した後、フィルターを0.025%Tween-20の入ったTBS液 (TTBS液と以下略す) に移し、5分処理し、さらに同操作をくり返した。抗ヒトアルブミン-ウサギ血清のIgG画分 (カッセル社製) を1%ゼラチン入りのTTBS液で2000倍に希釈し、この液中にフィルターを浸し、2〜18時間処理した。次に、フィルターをTTBS液中に

移し5分処理した。この操作をさらに2回行った。抗ウサギIgG-ヤギー西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識抗体 (Bio-rad社製) を1%ゼラチン含有のTTBS液で3000倍に希釈した液中にフィルターを移し、2時間処理した。同処理後、フィルターをTTBS液で2回、TBS液で1回、それぞれ5分間洗った。0.015% $H_2O_2$ 、0.05%HRPカラーデベロップメント・リジェント (Bio-rad社)、16.7%メタノール含有のTBS液にフィルターを浸し、15分反応させた。次に、フィルターを水につけ30分放置した。抗ヒト・アルブミン抗体と交差する物がある所は、濃い紫色に発色した (第12図)。分子量約37000の位置にphoA-mHSA、分子量約49000の位置に短縮形HSA、そして分子量約51000の位置にphoA-lHSA、のそれぞれに相当する抗ヒト血清アルブミン抗体と交差反応する発現生成物が認められた。

#### 参考例1. 正常ヒト血清アルブミンAcDNAを含むクローンのスクリーニング

正常ヒト血清アルブミンAcDNAを含むクローン

のブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため米国CLONTECH社の $\lambda$ gt11をベクターとして作成されたヒト肝cDNAライブラリーを用いた。 $\lambda$ gt11組換え体ファージを大腸菌Y1090を宿主として感染させ、形質転換ブランク合計 $5.5 \times 10^5$ 個をLB寒天培地(ルリア培地+1.5%寒天)上に形成させ組換えDNAをメンブランフィルター(Amersham社Hybond-N)に移した後、 $^{32}$ P放射性同位元素で標識した合成オリゴヌクレオチド3種(比活性 $\geq 10^7$ cpm/ $\mu$ g)をプローブとして用いスクリーニングした(Benton & Davis Science 196, 180-182(1977))。この3種のプローブは各々Lawnら(Nucleic Acids Res 9, 6103-6114(1981))によって報告されたヒト血清アルブミンcDNAの配列のうち5'非翻訳領域(翻訳開始のATGコドンより12ヌクレオチド上流からATGコドンの前のヌクレオチドまでの部分)と翻訳領域(アミノ末端のメチオニンコドンすなわちATGより9番目のアミノ酸ロイシンをコードする部分)を含むもの(HSA-1)、248番目のグリニン

ら260番目のロイシンをコードするもの(HSA-2)、並びに576番目のバリンからカルボキシル末端585番目のロイシンをコードする部分とそれに続く6ヌクレオチドから成る3'非翻訳領域を含むもの(HSA-3)と同じ配列である。これらのプローブの塩基配列を第5図に示す。このプローブの合成は自動DNAシンセサイザーにより行い、標識は( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて行った。HSA-2で陽性のシグナルを与えた200個の $\lambda$ gt11クローンのうち4個のクローンからDNAを調製(BlattnerらScience 202, 1279-1284(1978))し、これをEcoRI酵素で消化し、消化物のサザンブロットをHSA-2プローブとハイブリダイズさせた(Southern, E., J. Mol. Biol. 503-517(1975))。ハイブリダイズしたフラグメントは3つのクローンから得られ各々1.8 kb, 1.4 kb, 1.3 kbの長さであった。このうち1.8 kbと1.3 kbの長さのフラグメントをpUC19ベクターにサブクローニングした。このサブクローンをHSA-1とHSA-3を各々プローブとしてコロニーハ

イブリダイゼーション(Grunstein および Hogness Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965(1975))によりスクリーンした。この結果HSA-3のみにハイブリダイズするクローン $\lambda$ gt11(HSA-I-A)が得られた。このクローンの各種DNA断片を塩基配列決定用ベクターM13mp18およびmp19 RF-DNA上に移し、ダイデオキシヌクレオチドターミネーション法(Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977))により塩基配列を決定した。一方HSA-2をプローブとして行った $\lambda$ gt11クローンのブランクハイブリダイゼーションにおいて陽性のシグナルを与えたクローンのうち20個についてHSA-1をプローブとして再びブランクハイブリダイゼーションを行い、1個の陽性のシグナルを与えるクローン $\lambda$ gt11(HSA-II)を得た。これからファージDNAを調製しEcoRI消化物についてHSA-1をプローブとして用いサザンハイブリダイゼーションを行い1.25kbのフラグメント(HSA-II)がプローブとハイブリダイズすることを確認した。このフラグメ

ントの塩基配列をダイデオキシヌクレオチドターミネーション法で決定した。HSA-IIはHSA-3プローブとはハイブリダイズしなかった。この結果HSA-IIはカルボキシル末端側をコードする部分を欠き、HSA-I-Aはヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドン(TCA)が翻訳終止コドンのオバールコドンTGAに変化していることがわかった。この2つのDNAフラグメントの制限酵素地図を第6図に示す。酵素認識サイトの正確な位置は最終的な塩基配列から得た。

#### 参考例2. プラスミドpUC-phoAの作製

大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードする化学合成DNA配列を含むプラスミドpUC-phoAを次の様にして作製した。

大腸菌アルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードする下記の塩基配列を有するDNA断片を化学合成フラグメントから構築した。

EcoR I 30  
 AA TTC ATG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG  
 G TAC TTT GTT TCG TGA TAA CGT GAC  
 Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu

60  
 GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG  
 CGT GAG AAT GGC AAT GAC AAA TGG GGA CAC  
 Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val

Nae I  
 ACA AAA GCC GGC G  
 TGT TTT CGG CCG C TT A A  
 Thr Lys Ala Hpa II EcoR I

両末端側のEcoR I認識配列はPUC系プラスミドのEcoR Iサイトに挿入するために設けられ、Hpa II認識配列は後にHSA-A成熟遺伝子を融合させるために設けられ、そしてNae I認識配列はシグナルペプチドを構成する最後のアミノ酸(21番目のアラニン)をコードするコドンの直後で当該制限酵素で切断されて平滑末端を残し、これと成熟タンパク質をコードするDNA配列とを直接融合できるようにするために設けられた。72ヌクレオチドから成るDNA鎖2本はCaruthersら(Matteucci, M.D. and Caruthers, M.H. Tetrahedron

Letters 21,719(1980))により開発されたホスホアミダイト法を応用した自動DNA合成機(Applied Biosystemsモデル3808)を用いて合成された。合成されたDNA鎖はたとえば50mM Tris・HCl (pH 7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mMジチオスライトール及び0.2mMのATPを含有する溶液(50μl)中で両方のDNA鎖の各々の分量(21pmoles)を6単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造株式会社)存在下で37℃、60分処理することにより5'端をリン酸化した。

上記のリン酸化された2本のDNA鎖を含む溶液を混ぜ(計100μl)100℃の水浴に入れ、ついで室温で放冷してアニーリングを行った。アニールした2本鎖リン酸化DNAをpUC 19プラスミドに組み込む際に、当該DNAが組み込まれた組換えプラスミドを得る確率を高めるために、ベクターであるpUC 19プラスミドをEcoR Iで切断後5'末端のリン酸基を除去することによりDNAリガーゼ処理により再結合が起こる可能性を極力下げることができる。1μgのpUC 19 DNAを含む溶液20μl

(50mM NaCl、100mM Tris・HCl (pH 7.5)、7mM MgCl<sub>2</sub>、8単位のEcoR I(ニッポンジーン))を37℃、60分処理することにより、直鎖状のベクターDNAを得た。この反応溶液を90℃、5分処理し制限酵素を不活性化した後H<sub>2</sub>Oを38μl、バクテリアアルカリ性ホスファターゼ1単位(宝酒造株式会社)を加えて計60μlとし、37℃、60分処理した。この溶液をフェノール処理し、得られた水相をエタノール沈澱に供した。エタノール沈澱物は凍結乾燥して次の反応に用いた。

脱リン酸化されたpUC 19ベクター(30ng)とシグナルペプチドをコードするリン酸化2本鎖DNA(10ng)を2.8単位のT4 DNAリガーゼ(宝酒造)を含む計30μlの反応溶液(66mM Tris・HCl (pH 7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスライトール、1mM ATP)中で15℃、4時間処理し組換えプラスミドを得た。この反応液の10μlを宿主菌の大腸菌TB-1株を形質転換するのに用いた。

形質転換に用いる感受性大腸菌細胞はたとえば塩化カルシウム法(Mandel, M. 及び Higa, A., J. Mol.

Biol. 53,159-162(1970))により作成される。具体的には大腸菌(たとえばTB-1株)の一晚培養液(天然培地中、たとえばLB(LB)培地)を同じ培地で100倍希釈し、OD 600が0.6になるまで37℃で振とう培養し1.5mlを5,000rpm、5分遠心して集菌した。これを750μlの50mM CaCl<sub>2</sub>に懸濁し、氷上に20分放置した後遠心により集菌した。得られた沈澱を100μlの50mM CaCl<sub>2</sub>に再懸濁し、前記のDNAリガーゼ反応液を加え、氷上に40分放置した。42℃で1分保温した後、1mlのLB培地を加え、37℃で30分保温した。このうち0.1mlを25μg/ml、アンピシリンを含むX-Gal寒天培地(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド155mg、トリプトン10g、NaCl 8g、Difco寒天12gを水1ℓに溶かしpHを7.4にしたもの)上に塗布し、37℃に一晚保温した。寒天上に生じたコロニーのうち白色を呈するコロニーを選抜し、新しい寒天培地に移し、一晚保温した。その寒天培地から菌体を白金耳とり、LB培地に移し、一晚培養液を作成した。



1.5 mlの一晩培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレペレーションを常法(ManiatisらMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)により行った。得られたプラスミドDNAを適当な制限酵素(たとえばEcoRI, NaeI, HpaIIなどの挿入された合成DNA配列に含まれる認識配列を切断するものやpUC 19ベクター中に存在する認識配列を切断するもの、たとえばPvuII, BglII, SspIなど及びこれらの組合せ)で切断し、アガロース及びポリアクリルアミドゲル電気泳動により、挿入DNAの長さを調べ、適切な挿入DNAを含む組換えプラスミドを同定した。この挿入DNAを含むDNAフラグメントをM13mp系ファージDNAに再度組込み、ジデオキシ法(Sanger, F., Nicklen, S. 及び Coulson, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5464 (1977))によってヌクレオチド配列を決定し、最終的に目的とするpUC-phoAプラスミドを同定した。

配列を、化学合成したフラグメント2本をアニールすることにより作成した。この合成DNA配列はアルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードするDNA配列と融合できるようにHpaII及びClaI酵素切断によって生ずる粘着末端配列CGを5'端側に有し成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質の1番目のアミノ酸Aspから11番目のアミノ酸Pheをコードする配列を有している。このアニールさせたDNA配列にT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて5'端をリン酸化させたものと、pUC-HSA-EXから生じたAhaIII/SalI二重消化物とを混合し、さらにこれに大腸菌のマルチコピークローニングベクターの代表的なものの一つpAT 153(Amersham社製、Twigg, A.J. 及び Sherratt, D. Nature 283, 216-218, 1980)のClaI/SalIの二重消化物のうち大きなフラグメントと混合し、この3者をT4 DNAリガーゼにより結合させ、組換えプラスミドpAT-HSA-CXを得た。このプラスミド上で正常ヒト血清アルブミンAの1位のアミノ酸Aspから11位のアミノ酸

### 参考例3. プラスミドpUC-phoA-HSA-Aの作製 (第7-1図-第7-2図)

大腸菌アルカリ性ホスファターゼ(phoA)のシグナルペプチドと正常ヒト血清アルブミンAが融合したタンパク質をコードするDNAを含むプラスミドpUC-phoA-HSA-Aを次の様にして作製した。

ヒト肝cDNAライブラリーから得たHSAcDNAを含むクローンλgt11(HSA-II)からEcoRIとXbaI消化によって生ずるフラグメントを調製し、これをpUC 19プラスミドのEcoRIとXbaIとの二重消化物のうち大きな方のフラグメントとT4 DNAリガーゼを用いて結合させ組換えプラスミドpUC-HSA-EXを構築した。

このプラスミドからAhaIIIとSalIの二重消化により生ずる小さい方のフラグメントを精製した。このフラグメントは成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質の12番目のLysから356番目のThrまでをコードする。成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質をアミノ末端からコードする遺伝子を構築するために5'端に相当するDNA

PheをコードするDNA配列が繋がった。

pAT-HSA-CXをEcoRI/XbaIで二重消化し、正常ヒト血清アルブミンAのAsp1~Phe356をコードするDNA配列を含む小さい方のフラグメントを得た。

一方HSA-Aのカルボキシル末端側をコードするcDNAは、ヒト肝cDNAライブラリーから得たクローンλgt11(HSA I-A))から外来cDNA配列の挿入されているEcoRIフラグメントを調製し、pUC 18プラスミドのEcoRIサイトに挿入することにより組換えプラスミドpUC-HSA-1中にクローニングした。これによりHSA-Aの358番目のアミノ酸Leuからカルボキシル末端の585番目のLeuをコードし、さらに3'側の非翻訳領域62ヌクレオチドを含むXbaI/HindIIIの二重消化物を調製した。これをpAT-HSA-CXより得たEcoRI/XbaI二重消化物及びpUC 18のEcoRI/HindIII二重消化物のうち大きなフラグメントと混ぜてT4 DNAリガーゼにより連結反応を行い、成熟正常ヒト血清アルブミンAのcDNA全体を含む組換えプラスミドpUC-HSA-CH

を得た。

成熟正常ヒト血清アルブミンAの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を第8-1図〜第8-3図に示す。

成熟正常ヒト血清アルブミンAのcDNAをphoAシグナルペプチドをコードするDNA配列と連結するために、pUC-HSA-CHをEcoRI / ClaIで切断し、生ずる大きい方のフラグメントを得て、これとpUC-phoAをEcoRI / HspI (HpaIIと同じ認識配列を切断する)の二重消化により得られる小さい方のフラグメントとT4 DNAリガーゼを用いて連結させた。これにより構築されたプラスミドpUC-phoA-HSA-Aは、21アミノ酸から成るphoAシグナルペプチドが融合した成熟正常ヒト血清アルブミンAタンパク質をコードするDNA配列を含み、大腸菌HB101株に常法により形質転換法で導入されクローニングされた。

#### 参考例4. プラスミドpAT-trp-phoA-HSA-Aの作製

正常ヒト血清アルブミンAの発現プラスミドpAT-phoA-HSA-Aを次の様にして造成了。trp

プロモーターとtrpLのSD配列を有するベクターを用いてphoA-HSA-AcDNAの発現用ベクターを作製した。このようなベクターとしては例えばph-TNF (Ikeharaら、Chem.Pharm.Bulletin 印刷中)がある。これはpBR322ベクターにtrpプロモーターとtrpLのSD配列が導入されているものである。組換えプラスミドのコピー数を高め遺伝子量効果を期待する場合にはpBR322の複製阻害配列を除去して作成したpAT153 (Amersham Twigg, A.J. and Sherratt, D. Nature 283, 216-218 (1980))を基本とした組換えプラスミドを利用するとよい。例えばph-TNF上のtrpプロモーター/trpLSD配列を含むPstI / ClaIの二重消化物をpAT153の同じ酵素の組合せによる二重消化により生じた大きな方のフラグメントと融合すればこの目的は達成される。こうして作成されたpAT-trpベクターをSD配列の下流に1ヶ所あるClaI認識部位で切断し、生じた粘着末端の一本鎖部分を大腸菌DNAポリメラーゼIを作用させて埋めてできた直鎖状DNAをSalIで消化した。ここで得られる大

きい方のフラグメントをphoA-HSA-AcDNAとの接続に用いた。

一方pUC-phoA-HSA-AをEcoRI / HindIIIで二重消化することにより生じた小さい方のフラグメント(phoA-HSA-AcDNA配列を含む)をpAT153のEcoRI / HindIIIの二重消化物のうち大きい方のフラグメントと結合し組換えプラスミドpAT-phoA-HSA-Aを得た。これをEcoRIで消化して直鎖状DNAとした後大腸菌DNAポリメラーゼIを作用させて末端の一本鎖部分を埋めた後、SalIで切断し、小さい方のフラグメントをphoA-HSA-A cDNAを含む部分として回収した。このフラグメントを前述のpAT-trpベクター由来のフラグメントと連結し組換えプラスミドpAT-trp-phoA-HSA-Aを得た。

この組換えプラスミドを大腸菌HB101株及びC600株に導入し、形質転換株E. coli HB101(pAT-trp-phoA-HSA-A)及びC600(pAT-trp-phoA-HSA-A)を得た。

この発明の正常ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAを含有する組換えプラスミドpAT-trp-phoA

-HSA-Aを含有する大腸菌C600(pAT-trp-phoA-HSA-A)は工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌第9874号(PERM P-9874)として寄託された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のヒト血清アルブミン断片をコードするDNAの内Met(123)からAla(151)をコードする合成DNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す。

第2図は、cDNAクローンAg11(HSA-I)からプラスミドpUC-HSA-I及びpSALIIの作成過程を示す。

第3図は、本発明の発現プラスミドpAT-trp-phoA-SALIIの作製過程を示す。

第4図は、プラスミドpAT-trp-phoA-SALIIからの発現生成物の電気泳動図であって、抗ヒト血清アルブミン抗体と反応した蛋白質を示す。

第5図は、cDNAのスクリーニングに使用した3種類のプローブの塩基配列を示す。

第6図は、この発明のプラスミドの出発材料としての正常ヒト血清アルブミンAの全体をコード

するcDNA(HSACDNA)、並びにこのcDNAの造成に使用された、3'末端側をコードするcDNA(HSA-IA)及び5'末端側をコードするcDNA(HSA-II)の制限酵素地図を示す。

第7-1図～第7-2図は、この発明のプラスミドを作製するための種々の中間体プラスミドの作製過程を示す。

第8-1図～第8-3図は、この発明の正常ヒト血清アルブミンAの全体をコードするcDNAの塩基配列を示す。図中、アミノ酸152からアミノ酸303までの〔 〕内の配列は本発明のヒト血清アルブミン蛋白質断片のC-末端側のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を示す。

第9図はプラスミドpUC-phoA-mHSA及びpAT-trp-phoA-mHSAの作製の過程を示す。

第10図はプラスミドpUC-tHSA及びpAT-trp-tHSAの作製の過程を示す。

第11図はプラスミドpAT-trp-phoA-tHSAの作製の過程を示す。

第12図は、プラスミドpAT-trp-phoA-mHSA(レー

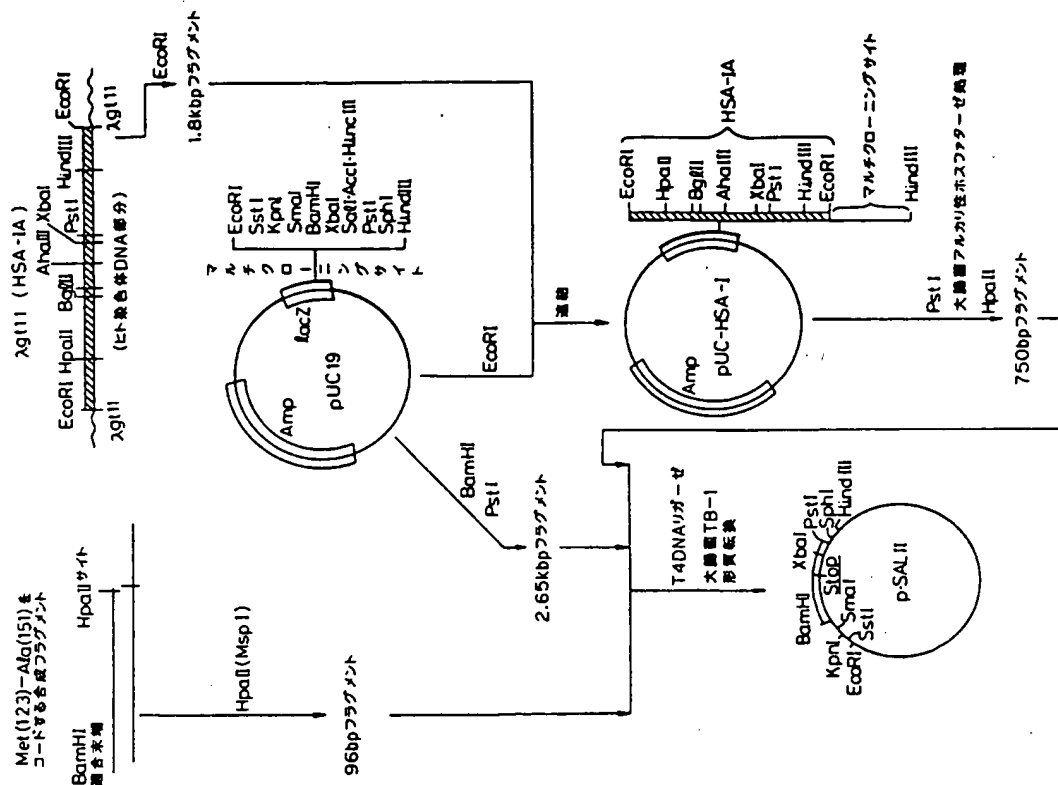
ン4)、pAT-trp-tHSA(レーン2)、及びpAT-trp-phoA-tHSA(レーン3)からの発現生成物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図であり、クマシーブリリアントブルーにより蛋白質バンドを染色してある。レーン1はサイズマーカーで、ホスホリラーゼB(分子量94,000)、ウシ血清アルブミン(分子量67,000)、オвалブミン(分子量43,000)、炭酸脱水素酵素(分子量30,000)、大豆トリプシンインヒビター(分子量20,000)、及びラクトアルブミン(分子量14,400)である。矢印が各々の発現生成物に相当する。

第13図はpAT-trp-mHSA(レーン1)、pAT-trp-tHSA(レーン3)pAT-trp-phoA-tHSA(レーン2)からの発現生成物のウエスタンブロット図であり、抗ヒト血清アルブミン抗体と反応した蛋白質を示す。

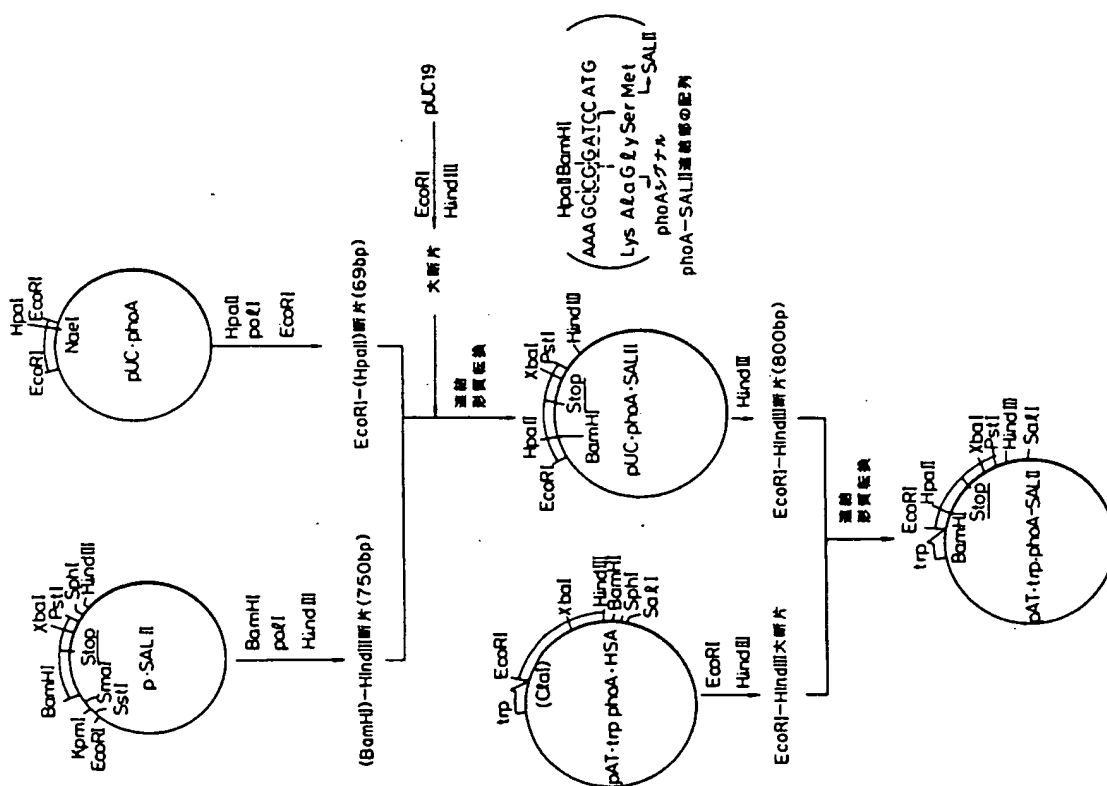
Bam HI  
GA TCC ATG TGC ACC GCT TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC GAA ATC GCT CGT CGT CAC  
G TAC ACG TGG CGA AAG GTG CTG TTG CTT CTT TGG AAG GAC TTT TTT ATG GAC ATG CTT TAG CGA GCA GCA GTG  
Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His  
(123)

Hpa II  
CCG TAC TTC TAC GCT CCG G  
GGC ATG AAG ATG CGA GGC CTT GAC GAC AAG AAG G  
Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala  
(151)

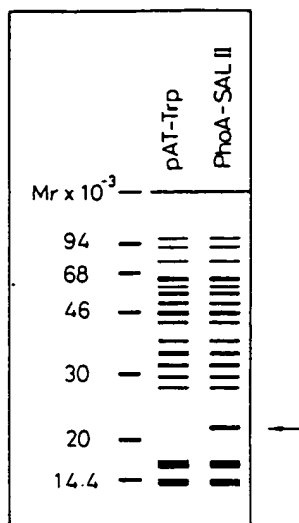
第 1 図



第 2 図



第 3 図



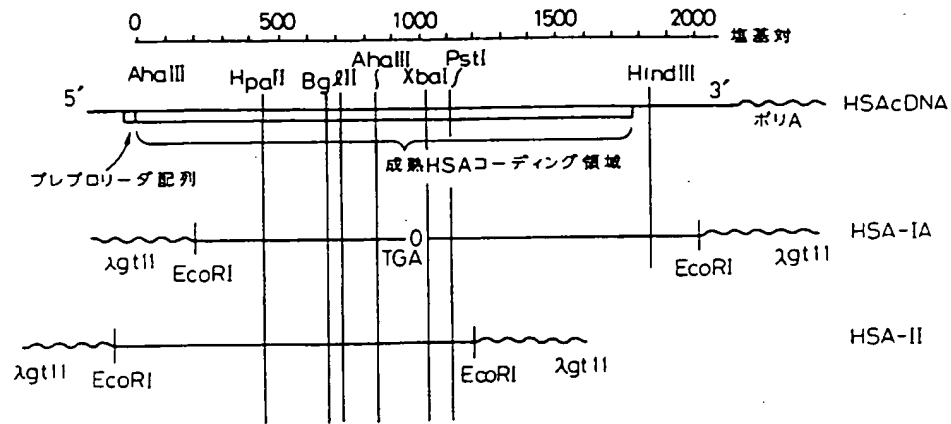
第 4 図

HSA -1 5'-AAGGGAAATAAAGGTTACCCACTTCAT TGTGCCAAAGGC-3'  
 5'-非翻訳領域-Met1-Leu9に相当する領域  
 (12ヌクレオチド)

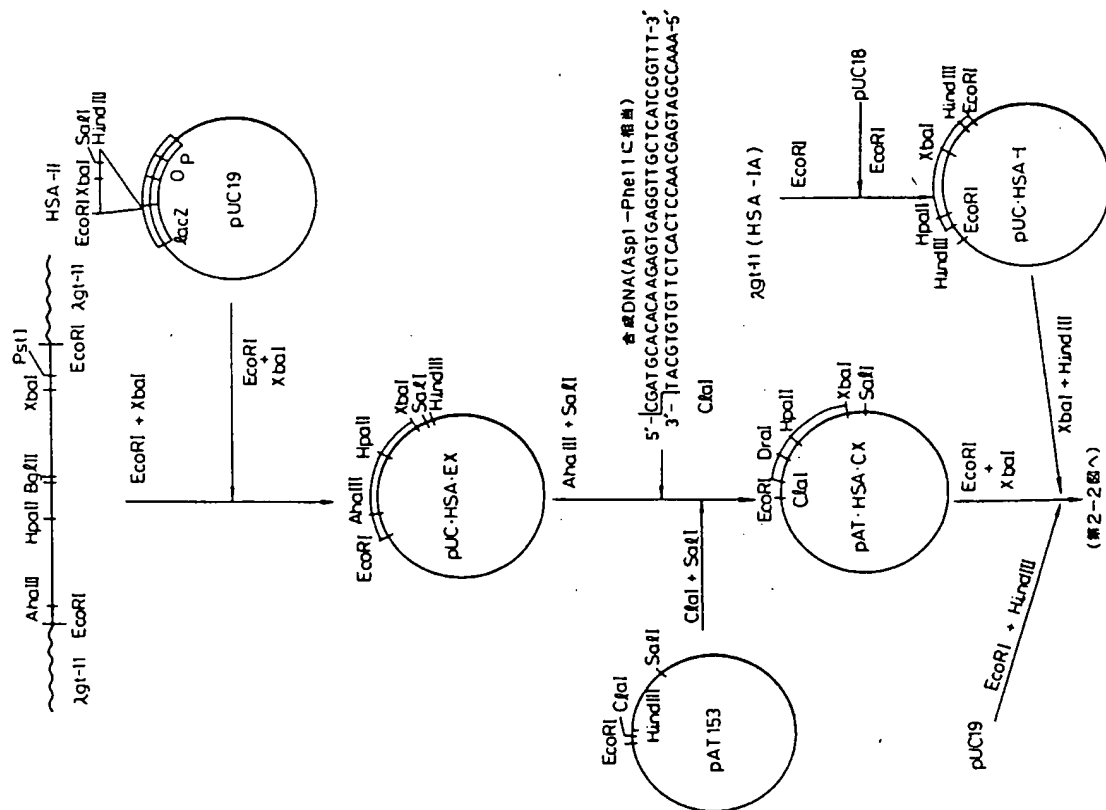
HSA -2 5'-AAGGTCCGCCCTGTCATCAGCACATTCAAGCAGATCTCC-3'  
 Gly248~Leu260に相当する領域

HSA -3 5'-TAGATGTTATAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGCAGCAAC-3'  
 Val576~Leu585~3'非翻訳領域に相当する領域  
 (6ヌクレオチド)

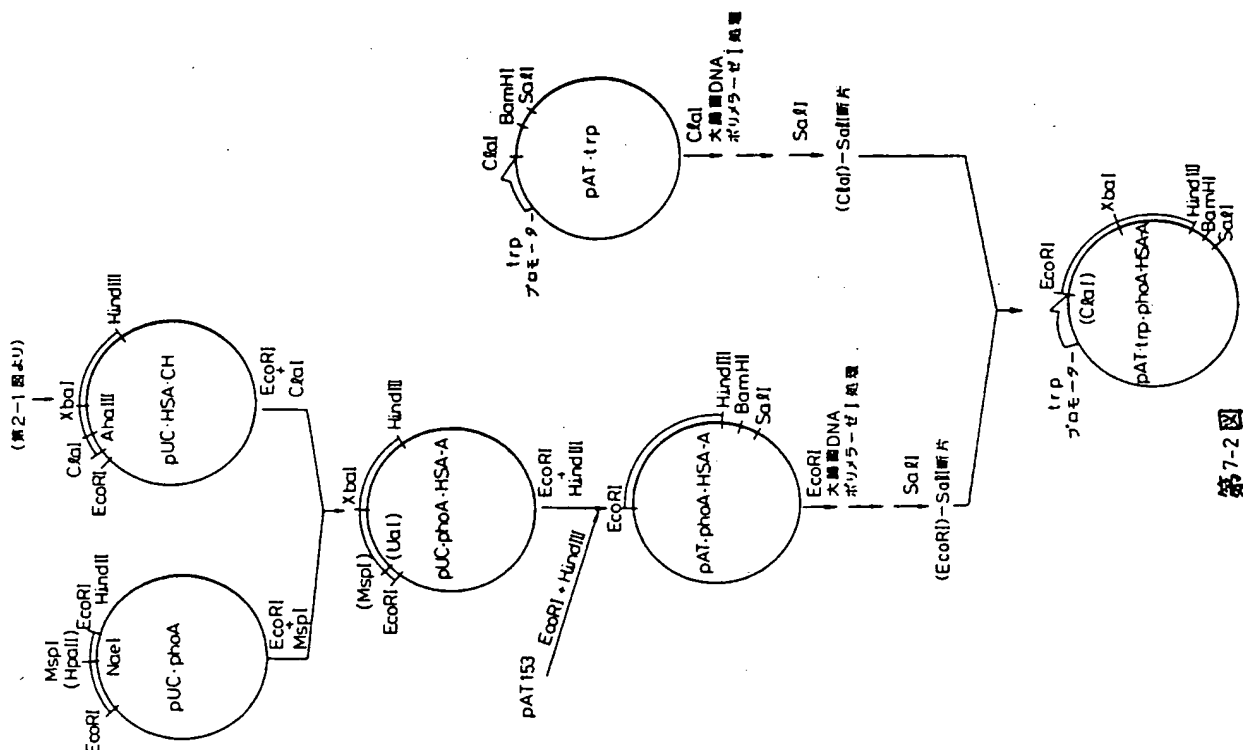
第 5 図



第 6 図



第7-1図



Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile  
 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT

50

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala  
 GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys  
 AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC

100

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu  
 ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT CAG AGA AAT GAA

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr  
 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT

150

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr  
 GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT

Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala  
 GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT

200

Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys  
 GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT

第8-1図

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys  
GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA 250

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu  
GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu  
CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG 300

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala  
AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val  
GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC 350

Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala  
TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp  
AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT 400

Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 450

## 第8-2図

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu  
TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu  
GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA 500

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys  
GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys  
TGC TGC ACA GAG TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys  
GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA 550

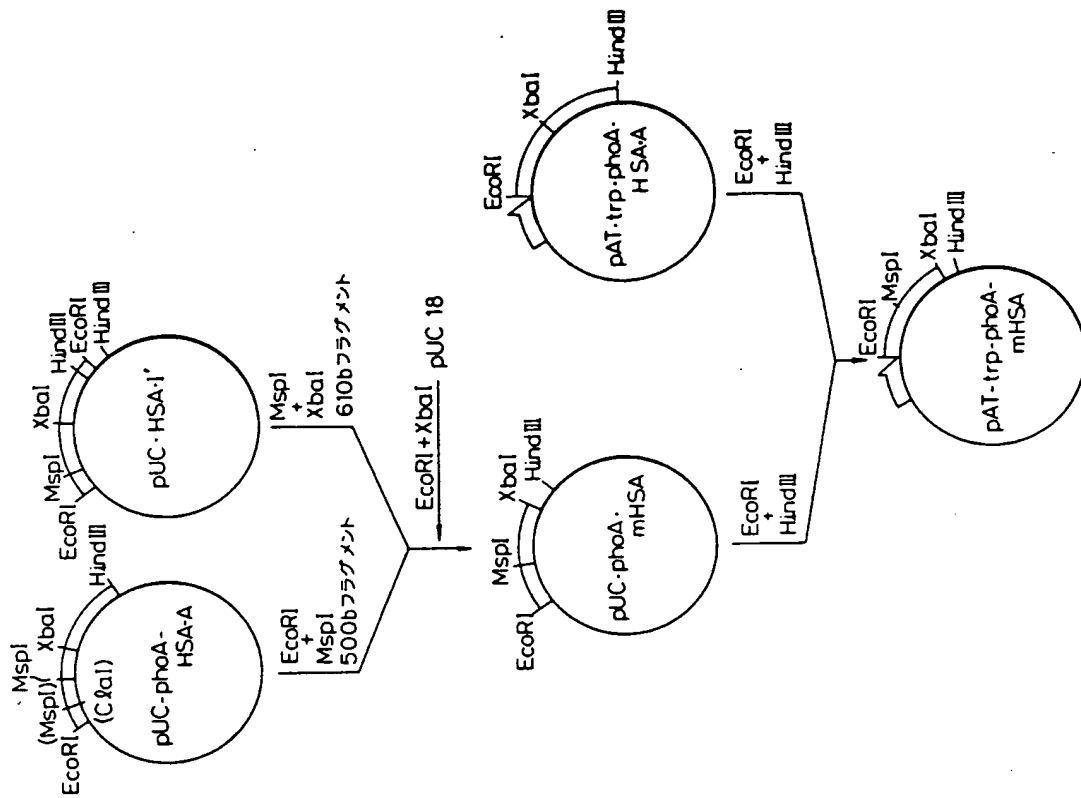
Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp  
CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT

Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu  
TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT

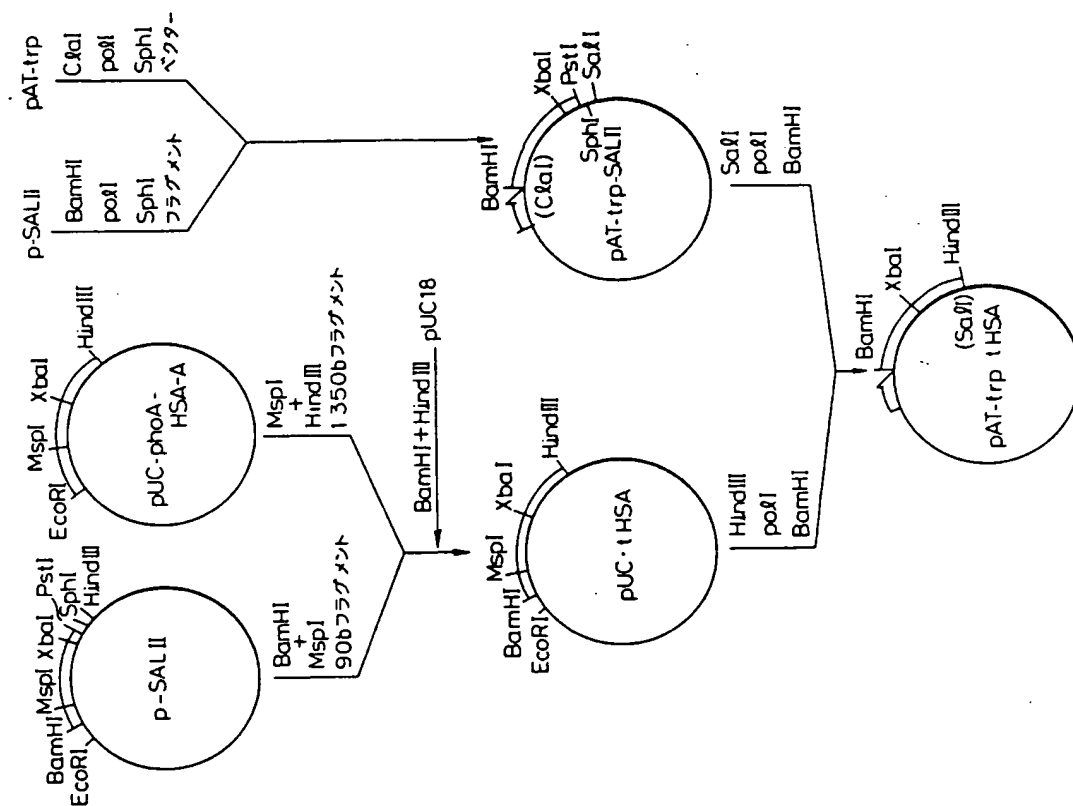
Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu End  
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA

## 第8-3図

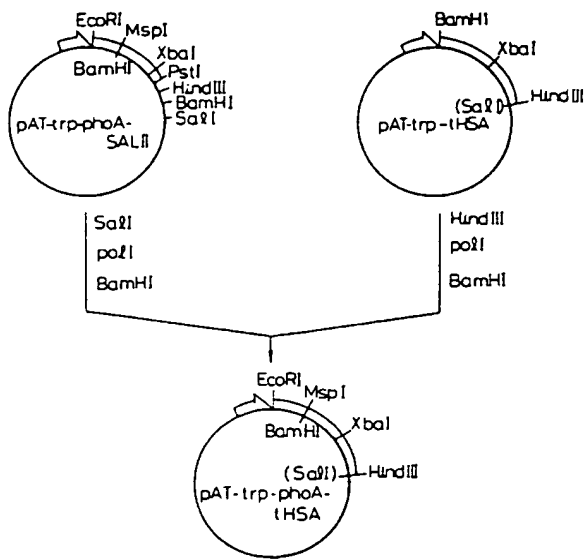




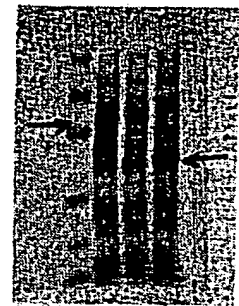
第 9 図



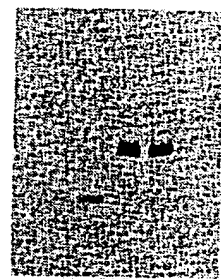
第 10 図



第 11 図



第 12 図



第 13 図

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

// A 61 K 37/04  
(C 12 N 1/21)  
C 12 R 1:19)  
(C 12 P 21/02  
C 12 R 1:19)

識別記号

A G Z

庁内整理番号

8615-4 C

Japanese Patent Office  
Public Patent Disclosure Bulletin

Public Patent Disclosure Bulletin No.: 2-227079

Public Patent Disclosure Bulletin Date:

September 10, 1990

Request for Examination: Not yet made

Number of Inventions: 17

Total Pages: 24

Int. Cl. <sup>5</sup>	Identification Code	Internal File Nos.
C 12 N	15/14	
C 07 K	13/00	8318-4H
	15/06	8318-4H
C 12 N	1/21	8515-4B
	15/62	
C 12 P	21/02	8214-4B
	ZNA C	

Title of Invention: Human serum albumin fragments

Patent Application No.: 1-217540

Patent Application Date: August 25, 1989

Claim of Precedence: October 6, 1988 Japan (JP)  
Application 63-250926

Inventor: Noboru Maki  
General Laboratory, Tonen Co., Ltd.  
1-3-1 Nishi Tsurugaoka, Oi-cho,  
Irima-gun, Saitama Pref.  
Shintaro Yaki  
101 Green Park Choshigaoka, 4-8-8

## Specification

### 1. Title of Invention:

Human serum albumin fragments

### 2. Claims:

1. Human serum albumin fragments, from the center part of human serum albumin.

2. A fragment in accordance with Claim 1 which has the amino acid sequence from the methionine in the 123rd position of human serum albumin to the proline in the 303rd position.

3. Fused proteins, consisting of central parts of human serum albumin and other polypeptides.

4. Fused proteins in accordance with Claim 1, consisting of signal peptide of coliform bacteria alkaline phosphatase and polypeptides which have the amino acid sequence from the methionine in the 123rd position of human serum albumin to the proline in the 303rd position.

5. Human serum albumin fragments, lacking the C terminus part of human serum albumin.

6. A fragment in accordance with Claim 5 which has the amino acid sequence from the aspartic acid in the 1st

13. DNA sequences which encode the protein fragments mentioned in Claims 1, 5, or 9 or the fused proteins mentioned in Claims 3, 7, or 11.

14. Plasmids containing the DNA sequences mentioned in Claim 13.

15. Plasmids mentioned in Claim 14, which are expression plasmids that have control sequences for efficiently expressing the said DNA sequences in a host, upstream in the aforementioned DNA sequences.

16. Hosts, the characters of which have been transformed by the plasmids mentioned in Claim 14.

17. A method for manufacturing human serum albumin protein fragments or fused proteins containing the said fragments, characterized in that human serum albumin protein fragments or fused proteins containing the said fragments are expressed by culturing the hosts mentioned in Claim 16, and in the case in which fused proteins are expressed, the said human serum albumin protein fragments are cleaved from the said fused proteins as desired.

eventually liberated from the albumins, pass through the capillary walls, and are dispersed, thus arriving at their sites of activity. Albumins have little toxicity and low antigenicity; they are easily decomposed in the body. They can be easily covalently bonded with drugs and formed into complexes. They have the advantages that they have excellent characteristics as substrates for drug delivery (drug carriers), and for many of them, bonding sites with various drugs have been determined or are suspected, so that they can be easily designed for the manufacturing of pharmaceutical preparations.

Fundamentally, almost all suspected bonding sites with many drugs are contained also in human serum albumin fragments, and are thought to be able to show activities as drug carriers. When used as carriers, etc., in transport and delivery systems for drugs, etc., from the point of view of limiting bonding ability with drugs, etc., it is predicted that it is more advantageous to use fragments of human serum albumin molecules, rather than the whole molecules.

In general, as methods for preparing fragments of proteins by cutting them, methods of using chemical substances such as cyanogen bromide or proteases such as trypsin, pepsin, etc. [to cut] proteins are known. However, in these methods, since the cutting sites are necessarily determined by the amino acid sequence of the proteins, it is not possible to cut them at any arbitrary desired site, and

fragments which is characterized in that, by culturing the aforementioned hosts, human serum albumin protein fragments or fused proteins containing these fragments are expressed, and in case the fused protein fragments are expressed, the said human serum albumin protein fragments are cut from the said fused proteins as desired.

#### Concrete Explanation of Invention

The cDNA which encodes normal human serum albumin A has already been cloned (Public Patent Application No. 63-037453). Therefore, using this cDNA, it is possible to manufacture any desired fragments of normal human serum albumin A by genetic engineering methods.

This invention provides, as such fragments, (1) serum albumin fragments from the central parts of human serum albumin; (2) serum albumin fragments lacking the C-terminus of human serum albumin; and (3) serum albumin fragments lacking the N-terminus of human serum albumin. For example, this invention provides, as examples of albumin fragments from the central parts of human serum albumin, albumin fragments which contain the amino acid sequence from the methionine in the 123rd position of human serum albumin to the proline in the 303rd position; as examples of albumin fragments lacking the C-termini, albumin fragments which contain the amino acid sequence from the aspartic acid in the 1st position of human serum albumin to the proline in the 303rd position (these are sometimes called "mini-HSA");

of diazepam, warfarin, and bilirubin are, respectively, Lys195 and His146, Arg145 and Trp214, and Lys199 and Lys240. On the other hand, the bonding sites for long-chain fatty acids such as palmitates appear to be in the C-terminus region [Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. and Peters, T., Tr. Biochemistry, 14, 4578- (1975); Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D. and Sklar, L. A., J. Biol. Chem., 254, 391- (1979)]; if the human serum albumin fragments from the central part of human serum albumin, or the human serum albumin fragments with the C-termini missing, of this invention are used, long-chain fatty acids cannot be bonded, and the production of drug carriers which can bond with diazepam, warfarin, etc., becomes possible.

Human serum albumins are high-molecular-weight proteins composed of 585 amino acids; they have 35 cysteine residues in their molecules, among which only the cysteine residue located closest to the N-terminus side (Cys-34) is present in a form which has a free SH group; the others form disulfide (S-S) bonds with each other; a total of 17 S-S bridges are formed in the molecule. It has recently been demonstrated that at least 2 enzymes [peptidylprolyl cis-trans isomerase and protein disulfide isomerase (PDI)] contribute to the process of forming higher-order (steric) structures of protein molecules; it is the latter, PDI, which plays an important role in forming S-S bridges. In the cells of mammals which produce serum albumin, PDI acts in



which can exhibit these characteristics are included in the scope of this invention. For example, the range from the methionine in the 123rd position to the proline in the 303rd position was given as an example of the central part in which drug bonding sites are concentrated; the central part is not, however, limited to this range, but may be longer or shorter than the 123rd position to the 303rd position, as long as most of the drug bonding sites are included in it. Moreover, the range from the 304th position to the C-terminus was given as an example of the C-terminus region in which long-chain fatty acid bonding sites are present and which must therefore be removed, but it is not limited to this example; the range may be longer or shorter, as long as it contains the long-chain fatty acid bonding sites. Furthermore, the range from the N-terminus to the 122nd position is given as an example of the range of the N-terminus, which contains many cysteines and which therefore must be removed, but it is not limited to this range; it may be longer or shorter, as long as it is an N-terminus region which contains the cysteine in the 34th position.

Therefore, various albumin fragments can be designed, by referring to the following conditions, and fall within the scope of this invention. The essential condition for designing human serum albumin fragments is that fragments be selected which can be expected to retain steric structures required for bonding specific drugs. The points which need

inside the 5' end or 3' end of the cDNA region which encodes the target protein fragment and the missing end code sequences are made up by chemically synthesized DNA. Otherwise, the cDNA can be cut by a suitable restriction endonuclease outside the 5' end or 3' end of the cDNA region which encodes the target protein fragment, and the excess DNA part is removed by an exonuclease. Of these two methods, different methods for processing the 5' end and the 3' end can be combined.

In the example of this invention, as the DNA which encodes the protein fragment composed of Met(123)-Pro(303) in the amino acid sequence of normal human serum albumin, synthetic DNA which encodes Met(123)-Ala(151) (Fig. 1) and cDNA which encodes Pro(152)-Pro(303) (the part shown in [ ] in Fig. 8-1 to Fig. 8-2), bonded together, are used. As the DNA which encodes a fused protein of the signal peptide of alkaline phosphatase and mini-HSA and which is used [in this invention], the DNA which encodes the signal peptide from alkaline phosphatase and human serum albumin A from Asp1 to Pro152, from the plasmid pUC-phoA-HSA-A, which contains the DNA which encodes the fused protein [composed of] the signal peptide of alkaline phosphatase and the whole length of the human serum albumin molecule, already described in Public Patent Application No. 63-037453, is fused with the DNA fragment which encodes Glu153-Pro303, cut from the plasmid pUC-HSA-I', already described in Public

according to the host. In expression plasmids in bacteria, the DNA which encodes the human serum albumin fragments or the fused proteins which include these fragments are placed at the base of the expression-controlling region, which includes a promoter and an SD sequence. For example, one can use trp promoter, lac promoter, lambda phage promoters ( $P_R$ ,  $P_L$ ), tufB promoter, or rrnB promoter, or hybrid promoters [composed] of these.

The transformation of the characteristics of the host, e.g., the coliform bacteria, by the expression vector, e.g., the plasmid, can be performed by the usual methods. The culturing of the coliform bacteria is performed by the usual methods. In order to produce the target proteins, after the coliform bacteria have multiplied to a specific level, the expression of the target genes is induced by performing an induction treatment. The method of the induction differs with the promoter being used; for example, when trp promoter is used, the induction can be performed by adding 3- $\beta$ -indole acrylic acid to the culture medium.

In cases in which coliform bacteria are used as hosts, the target protein is accumulated primarily in the cells. Therefore, in order to recover the protein, the cultured bacteria are first collected and washed, if desired, after which they are resuspended in water or a buffer solution and the cells are destroyed. Since the target protein is contained primarily in the insoluble fraction, the insoluble

central part of the human serum albumin have the advantages of both of these.

Next, the manufacturing of the human serum albumin fragments of this invention will be explained concretely by means of actual examples.

In the actual examples, unless otherwise specifically mentioned, the enzyme reactions for treating the DNA were performed under the following conditions.

#### Restriction enzyme reactions

In the cases of Msp I (Nippon Gene Co., 10 units/ $\mu$ l), BamH I (Nippon Gene Co., 35 units/ $\mu$ l), Cla I (New England Biolabs, 5 units/ $\mu$ l), Hind III (Nippon Gene Co., 12 units/ $\mu$ l), and EcoR I (Nippon Gene Co., 12 units/ $\mu$ l): sterile distilled water was added to 1  $\mu$ g DNA, 1  $\mu$ l enzyme, and 3  $\mu$ l 10X EcoR I buffer solution [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM  $MgCl_2$ , 500 mM NaCl] to make 30  $\mu$ l. The temperature was held at 37°C for 1 hour, to complete the cleavage. In the cases of Sal I and Xba I (Nippon Gene Co., 15 units/ $\mu$ l), in place of the 10X EcoR I buffer solution, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 70 mM  $MgCl_2$ , 1.75 M NaCl, 70 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM EDTA, and 0.1% bovine serum albumin were used.

In the cases of Pst I (Nippon Gene Co., 12 units/ $\mu$ l) and Sph I (Takara Shuzo Co., 10 units/ $\mu$ l), the concentration of the NaCl was doubled.

polynucleotide kinase (Takara Shuzo Co.) to perform the 5'-phosphorylation. The solutions containing the phosphorylated fragments are mixed (total 100  $\mu$ l) and kept for 5 minutes in a 100°C water bath, after which [this solution] is left to cool at room temperature; thus the annealing is performed. Two  $\mu$ l of T4 DNA ligase are added, and the temperature is kept at 16°C overnight, joining the fragments and making a double-chain fragment.

#### Coliform bacteria DNA polymerase I reaction

Sterile distilled water is added to 1  $\mu$ g DNA, 1  $\mu$ l DNA polymerase I (Klenow fragment, Takara Shuzo Co., 35 units/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 1 mM dXTP (mixture of dATP, dGTP, dCTP, and TTP), and 3  $\mu$ l 10X buffer solution [70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, and 70 mM MgCl<sub>2</sub>] to make a total quantity of 30  $\mu$ l; this was kept for 30 minutes at 37°C.

#### Actual Example 1. Synthesis of DNA encoding Met(123)-Ala(151)

The construction of a gene fragment which has a BamH I adhesion end on the 5' end, an Hpa II (Msp I) recognition sequence near the 3' end, and the double-chain part of which completely encodes the Met(123)-Ala(151) of human serum albumin was performed as follows. In order to express [these genes] efficiently in coliform bacteria, a sequence was designed which contained as many as possible of the codons

Shuzo Co.), at 37°C, for 60 minutes, and their 5'-ends were phosphorylated.

The 4 phosphorylated fragments were mixed and kept in a 100°C water bath for 5 minutes, after which they were left to cool to room temperature, to perform the annealing. Two  $\mu$ l of T4 DNA ligase (800 units, Takara Shuzo Co.) were added and the temperature was held at 16°C overnight, joining the fragments and making a double-chain fragment. Next, this double-chain fragment was cut with Hpa II (Msp I) to obtain a 96 bp fragment.

**Actual Example 2. Preparation of DNA fragment encoding human serum albumin fragment Met(123)-Pro(303) (Fig. 2)**

The lambda gt11 human cDNA clone (HSA-1A) lacking the part which encodes the amine end side of normal human serum albumin and containing a sequence in which the codon coding the 304th serine is changed to a translation termination codon (Reference Example 1, Fig. 6) was cut by EcoR I and the human serum albumin cDNA part was taken out; this was inserted into the EcoR I site of plasmid pUC19, making plasmid pUC-HSA-I.

pUC-HSA-I was cut with Pst I and the 5'-end phosphoric acid group produced was removed by treating with bacterial alkaline phosphatase; after this, the result was cut with Hpa II (Msp I), and the 750 bp fragment was removed. This 750 bp fragment was joined with the 96 bp fragment

signal peptide and the part of the HSA cDNA joined in this way, the nucleotide sequence GGATCC was produced, as an adaptor sequence, and since the two amino acids Gly-Ser are encoded, the fused protein actually synthesized by these fused genes takes the structure of the phoA signal peptide - Gly-Ser-Met123 to pro 303.

In order to express the fused protein in coliform bacteria, the pAT-trp-phoA-HSA-A (Reference Examples 3 and 4; Public Patent Application Bulletin No. 63-037453), which was used in the expression of the fused protein of phoA signal peptide-normal human serum albumin, was used. The pAT-trp-phoA-HSA-A was doubly digested by EcoR I and Hind III, and the larger of the fragments, which did not contain the phoA leader sequence-HSA cDNA part, was joined with the 800 bp fragment obtained by the double digestion of the pUC-phoA-SAL II plasmid by EcoR I and Hind III, by means of T4 DNA ligase, and the pAT-trp-phoA-SAL II plasmid was obtained.

By introducing the pAT-trp-phoA-SAL II plasmid into the coliform bacterium HB101, using the character transformation method, the coliform bacterium HB101 (pAT-trp-phoA-SAL II) was obtained.

This coliform bacterium was entrusted to the Microbiology Industry Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, as Bikokenkinki No. 10308 (FERM P-10308).

mM EDTA, and 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), and 0.2 mg/ml egg white lysozyme was added. The outer membranes were consumed by letting this stand at 37°C for 15 minutes, and the protoblasts (spheroblasts) were obtained. This suspension was transferred onto ice and cooled, after which it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes and the spheroblasts were precipitated. These spheroblasts were resuspended in a 20% sucrose solution [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA], and then pulverized in an ice bath by means of a Polytron [phonetic; poritoron] homogenizer (dial value: 8). The pulverized solution was centrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes, at 4°C, and a bacteria residue was obtained. This bacteria residue was resuspended in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), and the suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes, at 4°C. This operation was performed once more, and the precipitate obtained was used as the insoluble fraction.

#### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

##### 1) Analysis of bacteria total protein

0.5 ml of culture solution was centrifuged at 7000 rpm for 5 minutes, and the bacteria were collected. The bacteria were floated in 10  $\mu$ l SDS-sample solution [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% sucrose, 5% 2-mercaptoethanol] and treated at 100°C for 5 minutes. The result was applied to an SDS-polyacrylamide gel [Laemmli's method: Nature (London)]



(Bio-rad Co.), and 16.7% methanol, and reaction was performed for 15 minutes. Next, the filter was left standing in water for 30 minutes. The material which cross-reacted with the anti-human albumin antibodies was stained a deep violet at a certain place (Fig. 4). The expressed product of this invention was observed at the position of molecular weight 21,000.

**Actual Example 5.** Preparation of plasmid pUC-phoA-mHSA, containing a DNA sequence encoding a fused protein of coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and mini-HSA (Fig. 9)

The pUC-phoA-HSA-A mentioned in Reference Example 3, containing a DNA sequence encoding a fused protein of coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and mature human serum albumin A, was doubly digested with EcoR I and Msp I; the region from immediately before the methionine codon of the amine end of the signal peptide of the alkaline phosphatase to the codon of the 152nd position proline of the mature human serum albumin A (approximately 500 bp) was cut out. On the other hand, the recombinant plasmid pUC-HSA-I', containing a DNA sequence in which, of the precursor prepro human serum albumin A, the mature human serum albumin A was encoded up to the proline of the 303rd position, but the codon of the 304th position serine (TCA) was replaced with an opal codon (TGA), was doubly digested with Msp I and Xba I; a DNA fragment of approximately 610

which a DNA sequence encoding coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and mature human serum albumin A and its 3' side non-translation sequence are placed downstream from the EcoR I recognition site, which is downstream from the coliform bacteria tryptophan promoter, and the Hind III recognition site is located at the very end. Therefore, the larger of the DNA fragments obtained by double digestion using EcoR I and Hind III takes a form in which the DNA sequence encoding coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and mature human serum albumin A is lacking; by joining this with the DNA sequence encoding the fused protein of coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and mini-hSA, it was possible to construct the recombinant plasmid pAT-trp-phoA-mHSA, which has a structure in which the said fused protein could be expressed under the control of the coliform bacteria tryptophan promoter.

The pAT-trp-phoA-mHSA plasmid was introduced by the characteristic transformation method into coliform bacterium HB101 and coliform bacterium HB101 (pAT-trp-phoA-mHSA) was obtained. This bacterium was entrusted to the Microbiology Industry Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, as Bikokenkinki No. 10952 (FERM P-10952).

Actual Example 7. Preparation of recombinant plasmid pUC-tHSA, containing the DNA encoding contracted HSA

with coliform bacteria DNA polymerase I and the single-chain part of the end was buried by a nucleotide polymerization reaction. Next, cutting was performed with Sph I, and the larger of the DNA fragments was obtained. On the other hand, the recombinant plasmid pSAL II, containing a DNA sequence encoding the Met123-Pro303 (SAL II) of mature human serum albumin A, was cut at the BamH I recognition site, immediately before the Met123 codon, after which a nucleotide polymerization reaction was performed by using coliform bacteria DNA polymerase I, and the single-chain part of the end was buried. Next, cutting was performed with Sph I and the smaller of the DNA fragments, containing a DNA sequence encoding SAL II, was obtained. These 2 DNA fragments were joined to prepare a recombinant plasmid pAT-trp-SAL II, in which a DNA sequence encoding SAL II was placed downstream from the sequence derived from the coliform bacteria tryptophan operon. After this pAT-trp-SAL II was cut at the Sal I recognition site, located downstream from the SAL II DNA sequence, the single-chain DNA part was buried with coliform bacteria DNA polymerase I, and it was cut again at the site of the 5' end of the SAL II DNA by means of BamH I, cutting and removing the SAL II DNA. The larger of the DNA fragments obtained in this way was joined with a DNA fragment containing a DNA sequence encoding contracted HSA, obtained by cutting the pUC-tHSA plasmid with Hind III, burying the single-chain part with coliform bacteria DNA polymerase I, and cutting with BamH I; in this

treatment with DNA polymerase I was performed, burying the single-chain part, and a DNA sequence encoding contracted HSA was cut out by cutting with BamH I. These 2 DNA fragments were connected and a recombinant plasmid pAT-trp-phoA-tHSA, which expresses the fused protein phoA-tHSA in a form in which the alkaline phosphatase signal peptide and contracted HSA are sandwiched by spacers composed of the dipeptide Gly-Ser encoded by the BamH I recognition sequence GGATTC, was constructed. The pAT-trp-phoA-tHSA plasmid was introduced into the coliform bacterium HB101 by means of the characteristic transformation method, and the coliform bacterium HB101 (pAT-trp-phoA-tHSA) was obtained. This bacterium was entrusted to the Microbiology Industry Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, as Bikokenkinki No. 10951 (FERM P-1051 [sic]).

Actual Example 10. Expression of fused proteins composed of alkaline phosphatase signal peptide and mini-HSA or contracted HSA and the single contracted HSA molecule

The fused proteins of coliform bacteria alkaline phosphatase signal peptide and human serum albumin fragments or contracted human serum albumin A alone, were expressed by means of pAT-trp-phoA-mHSA, pAT-trp-tHSA, or pAT-trp-phoA-tHSA as follows.

#### Culturing

Coliform bacteria strains HB101 which had pAT-trp-phoA-mHSA, pAT-trp-tHSA, or pAT-trp-phoA-tHSA were cultured in 5

pulverized solution was centrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes, at 4°C, and a bacteria residue was obtained. This bacteria residue was resuspended in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), and the suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes, at 4°C. This operation was performed once more, and the precipitate obtained was used as the insoluble fraction.

#### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

##### 1) Analysis of bacteria total protein

0.5 ml culture solution was centrifuged at 7000 rpm for 5 minutes, and the bacteria were collected. The bacteria were floated in 10  $\mu$ l SDS-sample solution [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% sucrose, 5% 2-mercaptoethanol] and treated at 100°C for 5 minutes. The result was applied to an SDS-polyacrylamide gel [Laemmli's method: Nature (London) 277, 680 (1970)], with a separation gel concentration of 10%, and electrophoresis was performed.

##### 2) Analysis of insoluble fraction

The residue was resuspended in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5); part of this was taken and diluted with the SDS-sample solution. The insoluble protein was solubilized by treating at 100°C for 5 minutes, and gel electrophoresis was performed.

##### 3) Staining and destaining

After the electrophoresis was completed, the gel was immersed for 30 minutes to 1 hour in a staining solution

transferred to TBS solution containing 0.025% Tween-20 (abbreviated below as "TTBS solution"), and a treatment was performed for 5 minutes, after which the same operations were repeated. The IgG fraction of anti-human albumin rabbit serum (Cappel Co.) was diluted 2000-fold with TTBS solution containing 1% gelatin, the filter was transferred to this solution, and a treatment was performed for 2-18 hours. Next, the filter was transferred to TTBS solution and treated for 5 minutes. This operation was repeated 2 more times. The filter was transferred to a solution of goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated to horseradish-peroxidase (Bio-rad Co.), diluted 3000-fold with TTBS solution containing 1% gelatin, and a treatment was performed for 2 hours. After this treatment, the filter was washed twice with TTBS solution and once with TBS solution (5 minutes each time). The filter was transferred to a TBS solution containing 0.015%  $H_2O_2$ , 0.05% HRP chromogen reagent (Bio-rad Co.), and 16.7% methanol, and reaction was performed for 15 minutes. Next, the filter was left standing in water for 30 minutes. The material which cross-reacted with the anti-human albumin antibodies was stained a deep violet at certain places (Fig. 12). The expressed products of cross reactions of phoA-mHSA, contracted HSA, and phoA-tHSA with the corresponding anti-human serum albumin antibodies were observed at the positions of approximate molecular weights 37,000, 49,000, and 51,000, respectively.

non-translation region composed of the following 6 nucleotides (HSA-3). The base sequences of these probes are shown in Fig. 5. The synthesis of these probes was performed by using an automatic DNA synthesizer; the labelling was performed by using [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP and polynucleotide kinase. Among the 200 lambda gt11 clones which gave positive signals with HSA-2, DNA was prepared from 4 clones [Blattner et al., Science 202, 1279-1284 (1978)]; this was digested with EcoR I enzyme, and the Southern blot of the digested material was hybridized with the HSA-2 probe [Southern, E., J. Mol. Biol. 503-517 (1975)]. The hybridized fragments were obtained from 3 clones; their lengths were 1.8 kb, 1.4 kb, and 1.3 kb. Among these, the fragments with the lengths of 1.8 kb and 1.3 kb were sub-cloned with the pUC19 vector. These subclones were screened by colony hybridization [Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975)], using HSA-1 and HSA-3, respectively, as probes. As a result, a clone lambda gt11 (HSA I-A) which hybridized only with HSA-3 was obtained. Various DNA fragments of this clone were transferred to the vectors for determining base sequences M13mp18 and mp19 RF-DNA, and the base sequences were determined by the stain deoxynucleotide termination method [Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., Proc Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)]. On the other hand, with 20 of the clones which gave positive signals in the plaque hybridization of the lambda gt11 clones performed

```

EcoR I                                     30
AA TTC ATG AAA GAA AGC ACT ATT CCA CTG
G TAC TTT GTT TCG TCA TAA CGT GAC
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu

GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCG CTG
CGT CAG AAT GCG AAT GAC AAA TCG CCA GAC
Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val

Nae I
ACA AAA GCG GCG G
TGT TTT CCG CCG C TT A A
Thr Lys Ala

Hpa II      EcoR I

```

The EcoR I recognition sequences at both ends were prepared in order to perform an insertion into the EcoR I site of the PUC plasmid; the Hpa II recognition sequence was prepared in order to fuse the HSA-A mature gene afterward; and the Nae I recognition sequence was prepared so that [the DNA fragment] would be cut directly after the codon encoding the last amino acid (21st alanine) constituting the signal peptide and leave smooth ends, and this could be fused directly with the DNA sequence encoding the mature protein. Two DNA chains composed of 72 nucleotides were synthesized by using an automatic DNA synthesizer (Applied Biosystems Model 380B), applying the phosphoamidite method described in Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 21, 719 (1980). Quantities (21 pmoles) of each of the synthesized DNA chains were treated at 37°C for 60 minutes in, e.g., solutions (50 µl) containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol, and 0.2 mM ATP, in the presence of 6 units of T4 polynucleotide kinase (Takara Shuzo Co.), to perform phosphorylation of the 5' ends.



(10 ng) were treated at 15°C for 4 hours in a total of 30  $\mu$ l of a reaction solution [66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 6.6 mM  $MgCl_2$ , 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP] containing 2.8 units of T4 DNA ligase (Takara Shuzo Co.), and a recombinant plasmid was obtained. Ten  $\mu$ l of this reaction solution were used for transforming the characteristics of the host bacterium, the coliform bacterium TB-1 strain.

The sensitive coliform bacteria cells used in the characteristic transformation can be prepared by, for example, the calcium chloride method [Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 53, 159-162 (1970)]. Specifically, an overnight culture solution of coliform bacteria (e.g., the TB-1 strain) [in an agar-agar medium, e.g., Luria (LB) medium] was diluted 100-fold with the same medium, and culturing with agitation was performed at 37°C until the OD 600 became 0.6. 1.5  $\mu$ l were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes, and the bacteria were collected. These were suspended in 750  $\mu$ l of 50 mM  $CaCl_2$ , and after leaving this on ice for 20 minutes, the bacteria were collected by centrifuging. The precipitate obtained was resuspended in 100  $\mu$ l of 50 mM  $CaCl_2$ , and the aforementioned DNA ligase reaction solution was added; the resulting material (25  $\mu$ g/ml) was left on ice for 40 minutes. After the temperature was held at 42°C for 1 minute, 1 ml LB medium was added and the temperature was held at 37°C for 30 minutes. 0.1 ml of

(1977)], and finally, the target pUC-phoA plasmid was identified.

Reference Example 3. Preparation of plasmid pUC-phoA-HSA-A (Figs. 7-1, 7-2)

The plasmid pUC-phoA-HSA-A, containing DNA which encodes a fused protein composed of the signal peptide of coliform bacterial alkaline phosphatase (phoA) and normal human serum albumin A, was prepared as follows.

A fragment produced from clone lambda gt11 (HSA-II), containing HSA cDNA obtained from a human liver cDNA library, by digestion by EcoR I and Xba I, was prepared; this fragment was joined with the larger of the fragments obtained by double digestion of the pUC19 plasmid by EcoR I and Xba I, using T4 DNA ligase, and the recombinant plasmid pUC-HSA-EX was constructed.

The smaller of the fragments produced from this plasmid by double digestion by Aha III and Sal I was prepared. This fragment encodes [the part] from the 12th Lys to the 356th Thr of the mature normal human serum albumin A protein. In order to construct the genes which encode the mature normal human serum albumin A protein from the amine end, the DNA sequence corresponding to the 5' end was made by annealing 2 chemically-synthesized fragments. This synthetic DNA sequence has the adhesion end sequence CG produced by cutting with the Hpa II and Cla I enzymes on the 5' end side, so that it can fuse with the DNA sequence which

the pUC18 plasmid. In this way, [the part] of HSA-A from the 358th amino acid Leu to the 585th amino acid Leu of the carboxyl end was encoded; furthermore, a double digestion product by Xba I/Hind III, containing 62 nucleotides of the non-translation region of the 3' side, was prepared. This was mixed with the larger of the fragments of the double digestion product of EcoR I/Xba I obtained from pAT-HSA-CX and the double digestion product of EcoR I/Hind III of pUC18; a linking reaction was performed by T4 DNA ligase, and the recombinant plasmid pUC-HSA-CH, containing all of the cDNA of the mature normal human serum albumin A, was obtained.

Figs. 8-1 to 8-3 show the cDNA base sequences which encode all the amino acid sequences of mature normal human serum albumin A and the corresponding amino acid sequences.

In order to join the cDNA of the mature normal human serum albumin A with the DNA sequence encoding the phoA signal peptide, the pUC-HSA-CH was cut with EcoR I/Cla I and the larger of the fragments produced was obtained. Using T4 DNA ligase, this was joined with the smaller of the fragments obtained by the double digestion of pUC-phoA by EcoR I/Msp I (cutting the same recognition sequence as Hpa II). The plasmid pUC-phoA-HSA-A constructed in this way contained a DNA sequence encoding a fused protein consisting of phoA signal peptide (consisting of 21 amino acids) and mature normal human serum albumin A; it was inserted in

larger of the fragments obtained was used in the junction with phoA-HSA-AcDNA.

On the other hand, the smaller of the fragments produced by the double digestion of pUC-phoA-HSA-A by EcoR I/Hind III (containing the phoA-HSA-AcDNA sequence) was joined with the larger of the fragments produced by double digestion of pAT153 with EcoR I/Hind III, obtaining the recombinant plasmid pAT-phoA-HSA. After this was digested with EcoR I, making a straight-chain DNA, it was acted on by coliform bacteria DNA polymerase I to bury the single-chain part of the end. After this, it was cut with Sal I and the smaller of the fragments was recovered as the part containing the phoA-HSA-A cDNA. This fragment was joined with the previously-mentioned fragment from the pAT-trp vector, obtaining the recombinant plasmid pAT-trp-phoA-HSA-A.

This recombinant plasmid was introduced into the coliform bacteria strains HB101 and C600, and the characteristic transformation products *E. coli* HB101 (pAT-trp-phoA-HSA-A) and C600 (pAT-trp-phoA-HSA-A) were obtained.

The coliform bacterium C600 (pAT-trp-phoA-HSA-A), containing the recombinant plasmid pAT-trp-phoA-HSA-A which contains cDNA encoding the normal human serum albumin A, of this invention, was entrusted to the Microbiology Industry Technology Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, as Bikokenkinki No. 9874 (FERM P-9874).

Figs. 8-1 to 8-3 show base sequences of the cDNA encoding all of the normal human serum albumin A of this invention. In the figures, the sequence within [    ], from amino acid 152 to amino acid 303, shows the amino acid sequence of the C-end side of the human serum albumin protein fragment of this invention and the base sequence encoding it.

Fig. 9 shows the process of producing the plasmids pUC-phoA-mHSA and pAT-trp-phoA-mHSA.

Fig. 10 shows the process of producing the plasmids pUC-tHSA and pAT-trp-tHSA.

Fig. 11 shows the process of producing the plasmid pAT-trp-phoA-tHSA.

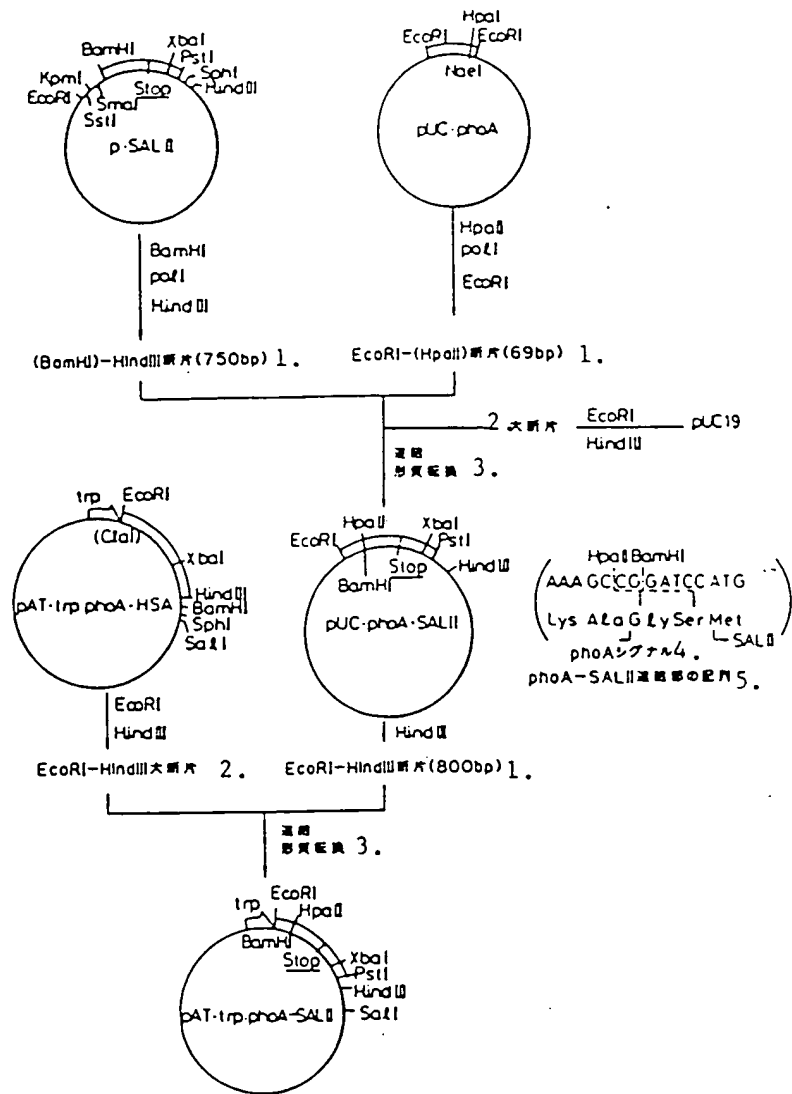
Fig. 12 is an SDS-polyacrylamide gel electrophoresis diagram of the expression products of the plasmid pAT-trp-phoA-mHSA (lane 4), pAT-trp-tHSA (lane 2), and pAT-trp-phoA-tHSA (lane 3); the protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1 represents the size markers: phosphorylase B (molecular weight 94,000), bovine serum albumin (molecular weight 67,000), ovalbumin (molecular weight 43,000), carboxylic acid dehydrogenase (molecular weight 30,000), soybean trypsin inhibitor (molecular weight 20,000), and lactoalbumin (molecular weight 14,400). The arrows indicate the various expression products.

Fig. 1

Bam HI  
 GA TCC ATG TGC ACC GCT TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC GAA ATC GGT GGT GGT CAC  
 G TAC ACG TCG CGA AAG GTG CTG TTG CTT CTT TCG AAG GAC TTT TTT ATG GAC ATG CTT TAG CGA GCA GCA GTG  
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His  
 (123)

Rpa II  
 CCG TAC TTC TAC GCT CCG C  
 GCG ATG AAG ATG CGA GCG CTT GAC CAC AAG AAG C  
 Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala  
 (151)

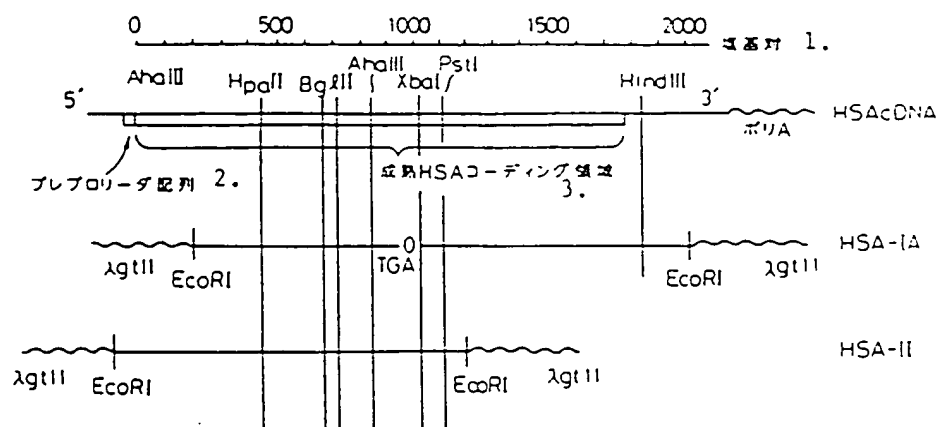
Fig. 3



## Key to Fig. 3

1. Fragment
2. Large fragment
3. Joining, characteristic transformation
4. Signal
5. Sequence of phoA-SAL II junction part

Fig. 6

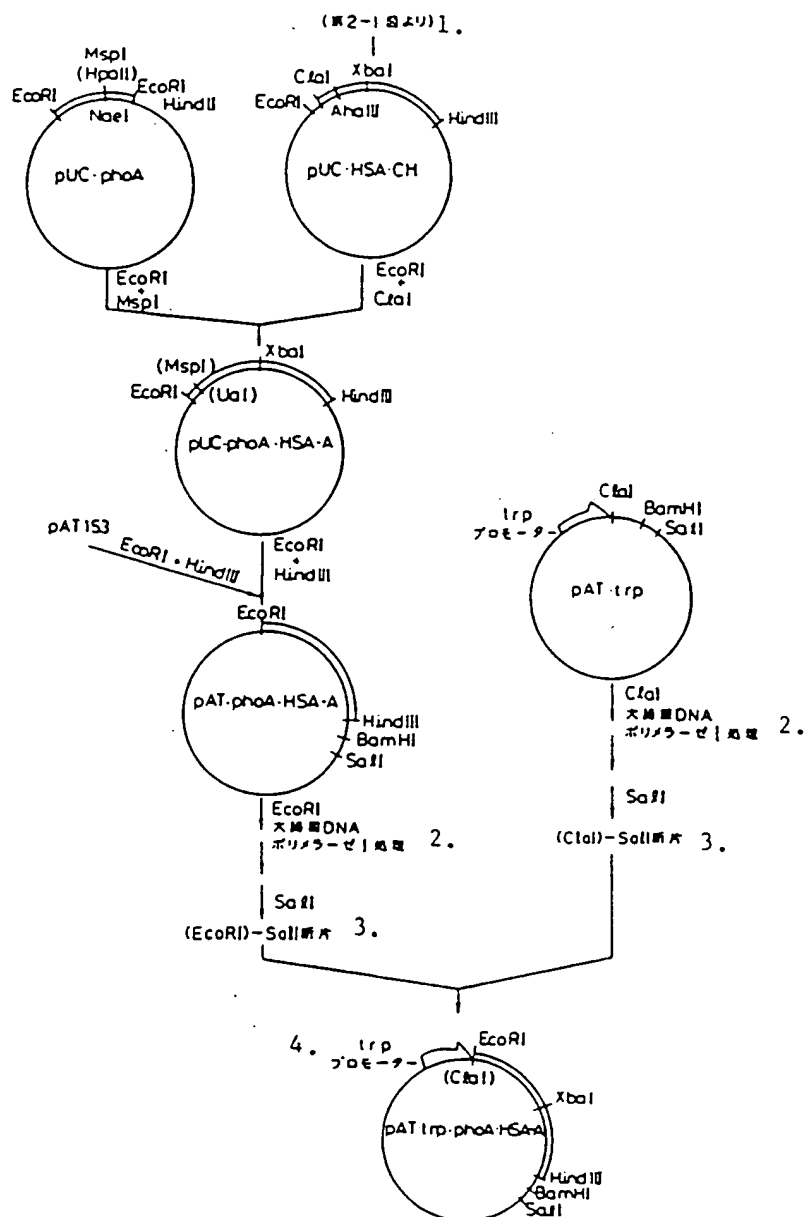


## Key to Fig. 6

1. Base pairs
2. Prepro leader sequence
3. Mature HSA coding region



Fig. 7-2



8-2

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys  
GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGC CCA GTA GCT CGC CTG ACC CAG AGA TTT CCC AAA

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu 250  
GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACC GAA TGC TGC CAT GCA GAT CTG

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu  
CTT GAA TGT GCT CAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala 300  
AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val  
GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC

Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala 350  
TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp  
AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT

Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu 400  
GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT CAG CAG CTT GGA GAG

8-3

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu  
TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu 450  
GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GCG AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys  
GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys 500  
TGC TGC ACA CAG TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA

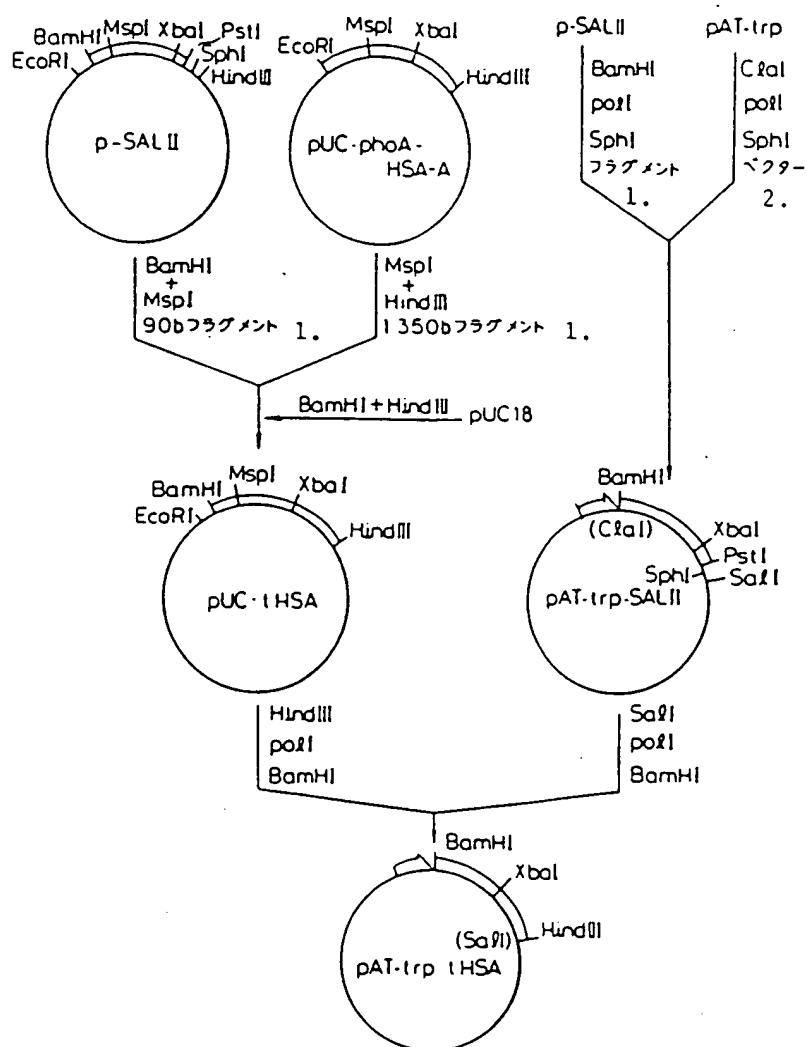
Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys  
GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp 550  
CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT

Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu  
TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT

Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu End  
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA

Fig. 10



Key to Fig. 10

1. Fragment

2. Vector